



# Epidémiologie moléculaire, facteurs de risque de transmission et pathogénicité du protiste parasite *Blastocystis* sp.

Dima El Safadi

## ► To cite this version:

Dima El Safadi. Epidémiologie moléculaire, facteurs de risque de transmission et pathogénicité du protiste parasite *Blastocystis* sp.. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II; Université Libanaise, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S045 . tel-01175820

**HAL Id: tel-01175820**

**<https://theses.hal.science/tel-01175820>**

Submitted on 13 Jul 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE EN COTUTELLE**

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

**L'Université de Lille 2**

**et**

**L'Ecole Doctorale Sciences et Technologies  
(Université Libanaise)**

**Spécialité : Microbiologie Médicale**

Présentée et soutenue publiquement par

**EL SAFADI Dima**

**Le 29 septembre 2014**

**Epidémiologie moléculaire, facteurs de risque de  
transmission et pathogénicité du protiste parasite  
*Blastocystis* sp.**

**Membres du Jury**

**Président du Jury :** Pr. E.M. ALIOUAT (Université de Lille 2, Lille, France)

**Directeurs de thèse :** Pr. M. HAMZE (Université Libanaise, Tripoli, Liban)

**Dr. E. VISCOGLIOSI** (Institut Pasteur de Lille, Lille, France)

**Pr. F. DABBOUSSI** (Co-directeur, Université Libanaise, Tripoli, Liban)

**Rapporteurs :** **Dr. C. COUSTAU** (Institut Sophia Agrobiotech, Nice, France)

**Pr. G. MATTAR** (Université Américaine de Beyrouth, Beyrouth, Liban)

**Examineurs :** **Dr. S. MONCHY** (Université du Littoral Côte d'Opale, Wimereux, France)

**Dr. N. HADDAD** (Université Libanaise, Beyrouth, Liban)

## DEDICACE

---

Aux personnes les plus chères

***Mes parents***

C'est grâce à votre amour, à vos sacrifices et à votre encouragement, que je suis parvenue à achever ce travail.

Que Dieu vous préserve santé et longue vie

***A mes sœurs, mes frères et mon amour***

A qui je dois tout,

Qu'ils veuillent trouver dans ce modeste travail, le résultat des encouragements incessants qu'ils ont consentis pour mes études, l'expression de ma très grande affection et de mes infinies reconnaissances. Je leur souhaite tout le succès et le bonheur du monde

*Dima*

## REMERCIEMENTS

---

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

En premier lieu, je tiens à remercier grandement mon directeur de thèse en France, **Eric Viscogliosi**, pour toute son aide, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail. Je remercie également mes directeurs de thèse au Liban **Monzer Hamze** et **Fouad Dabboussi** pour la formation scientifique de qualité qu'ils m'ont donnée. Leur grande rigueur scientifique et leur passion pour la science m'ont beaucoup appris.

Ma gratitude va aussi au Professeur **El Moukhtar Aliouat** qui me fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse.

Je tiens aussi vivement à remercier les Docteurs **Christine Coustau** et **Sébastien Monchy** en France et les Docteurs **Ghassan Mattar** et **Nabil Haddad** d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand remerciement au directeur du Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications (EDST6UL) au Liban, le Professeur **Mohamad Khalil** et au directeur de l'Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, le Professeur **Bernard Sablonnière** pour leurs disponibilités.

Je désire remercier les membres de l'équipe BDPEE à Lille au sein de laquelle j'ai effectué cette thèse. Je ne pouvais y espérer un meilleur accueil que celui qui m'a été octroyé. Je tiens à remercier tout particulièrement, **Dionigia Meloni** qui m'a encadrée dans mes deux premières années de thèse et m'a supportée avec beaucoup de patience. Je suis aussi ravie de remercier ma collaboratrice et amie, **Sadia Benamrouz**, pour son soutien affectif sans faille et ses multiples conseils toujours très pertinents. Tu resteras toujours ma grande sœur que j'aime beaucoup. Merci à **Amandine Cian** pour son aide et pour ces nombreuses heures à discuter de tout et de rien, ça va me manquer... Merci à toutes les autres personnes de cette équipe qui ont toujours été présentes pour m'aider (**Pilar**, **Gwendoline**, **Joanne**,



## REMERCIEMENTS

---

**Yuwalee, Linh, Gabriela, Karine, Nausicaa, Magali, Laurence, Emilie, Cécile Marie, Annie...).**

Je remercie également tous les membres du laboratoire Microbiologie, Environnement et Santé au centre AZM qui ont toujours été disponible pour m'aider et pour terminer à temps mes manipulations. Un Grand Merci à **Mariam, Imad, Taha, Houssam et Alaa.**

Pour leurs encouragements et leur assistance morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie chaudement mes collègues libanais (**Sara, Marwan et Sana**), mes amies algériennes (**Sara, Thanina et Asma**) et mes amis français (**Lobna, Ester et Thomas**). Merci à tous ceux qui ont contribué de façon directe ou indirecte à la réalisation de ce travail. J'ai été grandement sensible à votre aide et à votre gentillesse.

Enfin cette thèse n'aurait pas pu se faire sans le soutien financier du Conseil National de la Recherche Scientifique (CNRS) Libanais et de l'association AZM et SAADE.

## RESUME

---

*Blastocystis* sp. est un protozoaire anaérobie trouvé dans le tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Il est à ce jour le parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé dans les selles humaines. Dix-sept sous-types (ST1 à ST17) ont été décrits en se basant sur la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 18S. L'infection à *Blastocystis* sp. est associée à une variété de troubles gastro-intestinaux et plusieurs études suggèrent une corrélation entre la pathogénicité et le ST du parasite. Trois différents axes de recherche ont été développés. Le premier s'est focalisé sur la prévalence et la biodiversité génétique de ce parasite dans les populations humaines. Des études épidémiologiques ont été menées en France et au Liban mais aussi en Afrique en réalisant la première enquête au Sénégal. Le sous-typage des isolats a été réalisé par PCR en temps réel en ciblant un domaine du gène de l'ARNr 18S suivi d'un séquençage direct du produit de PCR. Au Liban, la prévalence de *Blastocystis* était de 19% dans la population totale avec une corrélation entre le ST1 et le développement de symptômes gastro-intestinaux. Dans le même pays, cette prévalence dépassait les 60% chez des patients symptomatiques et des écoliers. Au Sénégal, la prévalence observée est la plus importante jamais décrite pour ce parasite puisqu'elle atteignait 100% dans une population d'une centaine d'enfants vivant en milieu rural. Ces données soulignent l'impact socioéconomique de la blastocystose dans les pays en développement où les conditions sanitaires sont souvent précaires. En France, une prévalence importante de 18,3% a pourtant été observée dans une large étude épidémiologique englobant des patients présentant ou non des symptômes et suivis dans 11 hôpitaux répartis sur tout le territoire français. Le ST3 est prédominant suivi des STs 1, 2 et 4 comme dans une majorité de pays à travers le monde. Des variations saisonnières de la prévalence de ce parasite ont aussi été observées puisqu'elle était de 13,7% en hiver et de 23,5% en été. Le deuxième axe s'est concentré sur l'identification des facteurs de risque de transmission de *Blastocystis* sp. à l'homme. Le parasite a été recherché dans les selles de vaches et de patients ainsi que dans des échantillons d'eau consommée par l'homme et les animaux dans une région géographique limitée du Nord-Liban. 30% des échantillons humains, 69% des échantillons d'eau et 80% des échantillons de bovins étaient positifs pour le parasite. Le ST3 était prédominant dans les échantillons humains et d'eau suivi des ST1, ST2 et ST4. Par contre, ST10 et ST14 étaient prédominants chez les bovins mais ces deux STs n'ont pas été retrouvés dans les autres types d'échantillons. Pour expliquer l'absence des ST10 et ST14 dans ces échantillons, une transmission de ces STs par contact direct entre les bovins et/ou l'absence de formes kystiques transmissibles pour ces STs ont été proposées. Ce parasite a aussi été recherché dans les selles de nombreux groupes d'animaux du zoo de La Palmyre en France. Nous avons montré que près de 40% des selles analysés étaient positives pour

## RESUME

---

*Blastocystis* sp. et identifié de nouveaux réservoirs d'infections pour l'homme chez les carnivores. La prévalence du parasite atteignait 60% chez les primates chez lesquels les ST1 à ST5 identifiés sont identiques à ceux observés chez l'homme confirmant la faible spécificité d'hôte de ces STs. Dans une autre étude, la prévalence de *Blastocystis* sp. était de seulement 3,5% dans une population de chiens en France suggérant que cet animal n'est pas un hôte naturel de *Blastocystis* sp.. Enfin, pour clarifier la pathogénicité de ce parasite, le troisième axe de mes travaux a souligné le caractère invasif de *Blastocystis* sp. dans un cas de péritonite appendiculaire chez une fillette de 9 ans de retour du Maroc. Seul *Blastocystis* sp. a été détecté dans les selles, l'appendice, le liquide péritonéal et le cul-de-sac de Douglas de cette patiente. Une gastro-entérite s'est de plus déclarée simultanément chez 26 membres de la famille de l'enfant suggérant une épidémie qui pourrait trouver son origine dans la consommation commune d'une eau contaminée.

## ABSTRACT

---

*Blastocystis* sp. is an anaerobic parasitic protozoa found in the digestive tract of humans and numerous animals. To date, it is the most common intestinal parasite found in human feces with worldwide distribution. Seventeen subtypes (ST1-ST17) have been described based on the comparison of SSU rRNA gene sequences. *Blastocystis* sp. infection is associated with various gastrointestinal disorders and many studies suggest a correlation between *Blastocystis* sp. STs and pathogenicity. My work was developed on three different topics. The first concerned the prevalence and the genetic biodiversity of the parasite in human populations. Epidemiological studies were conducted in France and Lebanon but also in Africa by performing the first survey of this parasite in Senegal. Subtyping of the isolates was performed by real-time PCR targeting a domain of the SSU rRNA gene followed by direct sequencing of the PCR product. In Lebanon, the prevalence of *Blastocystis* sp. reached 19% in the general population and we demonstrated a correlation between ST1 infection and the presence of symptoms. In the same country, this prevalence was 60% in schoolchildren and patients presenting gastrointestinal symptoms. Strikingly, the prevalence of *Blastocystis* sp. in a population of one hundred children living in a rural area reached 100% in Senegal and more than half of the infected children by the parasite presented gastrointestinal disorders. These latter studies highlighted the socioeconomic impact of blastocystosis in developing countries with poor hygiene sanitation. In France, a large-scale molecular epidemiological study was performed including patients presenting or not gastrointestinal symptoms. Stool samples were collected during winter and summer in 11 hospitals spread all over the French territory. We observed a high prevalence of *Blastocystis* sp. in the french population with an average of 18.3% and the predominance of ST3 followed by ST1, ST4 and ST2 as in numerous countries. We also identified seasonal variations since the average prevalence of the parasite is 13.7% in winter and 23.5% in summer. The second topic focused on the identification of the risk factors of *Blastocystis* sp. transmission to humans. We searched this parasite in bovid and human stools as well as in drinking water samples consumed by bovinds and breeders in a limited geographic area of North-Lebanon. 30% of human samples, 69% of water samples and 80% of bovid samples were positive for the parasite. Interestingly ST3 is predominant in human and water samples followed by ST1, ST2 and ST4. ST10 and ST14 were predominant in bovid but both STs are lacking in human and water samples. To explain the lack of ST10 and ST14 in human and water samples, we suggested a transmission of these STs occurring through direct contact between bovid and / or the absence of transmissible cystic forms of these STs. Furthermore, this parasite was searched in the stools of numerous animal groups in the zoo of La Palmyre in France. We showed that nearly 40% of the

## ABSTRACT

---

analyzed stools were positive for *Blastocystis* sp. and identified new reservoirs of human infections in carnivores. The prevalence of the parasite reached 60% in primates in which the identified ST1 to ST5 are identical to those observed in humans confirming the limited host specificity of these STs. In another study, we showed that the prevalence of *Blastocystis* sp. was of only 3.5% in a population of one hundred dogs in France suggesting that this pet is not a natural host of *Blastocystis* sp. Finally, to clarify the pathogenicity of this parasite, the third topic highlighted the invasive character of *Blastocystis* sp. observed in a case of appendicular peritonitis in a 9-year old girl returning from Morocco. Only *Blastocystis* sp. was detected in stools, appendix, peritoneal liquid and Douglas pouch of the patient. Interestingly, simultaneous gastroenteritis occurred in 26 members of the child's family suggested an outbreak with contaminated water as probable origin.

## ABREVIATIONS

---

ADN	Acide Desoxyribonucléique
ARNr 18S	Acide Ribonucléique de la petite sous unité ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
Caco-2	Caucasian colon adenocarcinoma (epithelial cells)
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
EF	Facteur d'élongation
FECT	Formol Ethyl Acetate Concentration Technique
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HSP	Heat shock protein
IBS	Irritable Bowel Syndrome ou Syndrome du Côlon Irritable
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobase
lsrRNA	Large subunit ribosomal RNA
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry
Milieu LB	Milieu Luria-Bertani
Mpb	Millions de paires de bases
MDR	Multi drug resistance
MEM	Minimal Essential Medium
MFS	Major Facilitator Superfamily
MLO	Mitochondrion-Like Organelle
NF-kB	Nuclear factor kappa B
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI-IBS	IBS post-infectieux
PKS	Polykétide synthase
RAPD	Random Amplified of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROCK	Rho-associated Coiled-coil Kinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
sp.	Espèce

## ABBREVIATIONS

---

ssrRNA	Small subunit ribosomal RNA
ST	Sous-type
STS-PCR	Sequence Tagged Site-PCR
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
ZO	Zona occludens

## PUBLICATIONS

---

**Mon travail de thèse a pour l'instant donné lieu aux publications suivantes :**

Fréalte E\*, **El Safadi D**\*, Cian A, Aubry E, Certad G, Osman M, Wacrenier A, Dutoit E, Creusy C, Dubos F, Viscogliosi E (2014). *Blastocystis* infection in Casablanca (Morocco) resulting in gastroenteritis and suppurative appendicitis with peritonitis in a 9-year-old child. Emerging Infectious Disease, sous presse.

**\* Co-premiers auteurs**

**El Safadi D**, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, Hamze M, Riveau G, Viscogliosi E (2014) Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide BMC Infectious Disease, 14:164 (**Highly accessed**).

**El Safadi D**, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, Wawrzyniak I, Delbac F, El Alaoui H, Delhaes L, Dei-Cas E, Mallat H, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E (2013) Molecular Epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and Correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 88:1203–1206.



## COMMUNICATIONS

---

**Mon travail de thèse a pour l'instant donné lieu aux communications suivantes dans des congrès nationaux et internationaux :**

2014. 20<sup>th</sup> Scientific International Conference, Lebanese Association for the Advancement of Science, Beyrouth, Liban. **El Safadi D**, Osman M, Hamze M, Viscogliosi E. Epidémiologie moléculaire et transmission du parasite *Blastocystis* au Liban.

**(Communication orale par la candidate)**

2014. 20<sup>th</sup> Scientific International Conference, Lebanese Association for the Advancement of Science, Beyrouth, Liban. Osman M, **El Safadi D**, Benamrouz S, Guyot K, Aliouat EM, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E, Certad G. Epidémiologie moléculaire de la cryptosporidiose au Liban.

2014. Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale (SFMM) et Société Française de Parasitologie (SFP), Reims, France. Osman M, **El Safadi D**, Benamrouz S, Guyot K, Aliouat EM, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E, Certad G. Détection et caractérisation moléculaire d'isolats de *Cryptosporidium* sp. provenant du Nord-Liban.

2014. 5<sup>th</sup> International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference, Uppsala, Sweden. Osman M, **El Safadi D**, Benamrouz S, Guyot K, Dei-Cas E, Aliouat EM, Hamze M, Dabboussi F, Viscogliosi E, Certad G. Prevalence, genetic diversity and risk factors of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections among school children in Lebanon.

2013. 1<sup>ères</sup> Journées Franco-Maghrébines de Parasitologie et Mycologie, Rabat, Maroc. **El Safadi D**, Osman M, Cian A, Delhaes L, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E. Epidémiologie moléculaire du parasite *Blastocystis* au Liban.

**(Communication orale par la candidate)**

2013. 1<sup>ères</sup> Journées Franco-Maghrébines de Parasitologie et Mycologie, Rabat, Maroc. Osman M, **El Safadi D**, Benamrouz S, Guyot K, Aliouat EM, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E, Certad G. Epidémiologie moléculaire de la cryptosporidiose au Liban.

2013. 13<sup>ème</sup> Journée André Verbert, Colloque des doctorants, Ecole doctorale Biologie Santé, Lille. **El Safadi D**, Osman M, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E. Epidémiologie moléculaire, transmission et pathogénicité du protiste parasite *Blastocystis* sp.

## FORMATIONS

---

**Durant ma thèse, j'ai eu la possibilité de participer aux formations suivantes :**

Bibliométrie en Biologie Santé (Ecole Doctorale Biologie Santé, Lille, France) : 12 janvier 2014 (7h)

Expérimentation animale niveau II (Institut Pasteur de Lille, France) : 16 au 24 septembre 2013 (42h)

Statistiques des petits échantillons (Université Lille 2 Droit et Santé, Lille, France) : 26 au 28 juin 2013 (21h)

Bioinformatique et Biostatistique (Centre AZM/Université Libanaise, Tripoli, Liban) : Novembre 2012 (10h) et du 31 octobre au 19 décembre 2011 (21h)

Training courses in English (Centre AZM/Université Libanaise, Tripoli, Liban) : 1<sup>er</sup> au 30 Octobre 2012 (16h)

Conception, développement et utilisation d'un cours en ligne (Agence Universitaire de la Francophonie) : 15 au 19 octobre 2012 (27h)

Anglais Module 2 (Ecole Doctorale Biologie Santé, Lille, France) : 5 février au 30 Avril 2012 (15h)

Gestion de la rédaction et de la publication scientifique en ligne (Agence Universitaire de la Francophonie) : 12 au 16 décembre 2011 (32h)

Personnel Strategic Planning (International Academy of Personal Training and Leadership Development, Tripoli, Liban) : 6, 13 et 20 décembre 2011 (16h)

9th Arab Conference for Antimicrobial Agents (Université Américaine de Beyrouth, Beyrouth, Liban) : 15 au 17 Novembre 2011 (27h) **Pas de présentation.**

# SOMMAIRE

---

<b><u>Introduction</u></b>	1
<b><u>Analyse bibliographique</u></b>	3
<b>I. La biologie de <i>Blastocystis</i> sp.</b>	3
I.1. Un organisme polymorphe	3
I.1.1. La forme vacuolaire	4
I.1.2. La forme granulaire	4
I.1.3. La forme kystique	5
I.1.4. La forme amiboïde	5
I.1.5. Les autres formes	6
I.2. Une reproduction et un cycle biologique encore hypothétiques	6
<b>II. La taxonomie et la diversité génétique de <i>Blastocystis</i> sp.</b>	8
II.1. Sa découverte et sa classification au sein des eucaryotes	8
II.2. La diversité génétique des isolats et la classification au sein du genre <i>Blastocystis</i>	10
<b>III. Les méthodes de diagnostic de <i>Blastocystis</i> sp. et sa mise en culture</b>	12
III.1. L'observation microscopique des selles	12
III.2. La mise en culture des selles	13
III.3. Les méthodes moléculaires et le sous-typage des isolats	14
<b>IV. Une forte prévalence de <i>Blastocystis</i> sp. dans la population humaine</b>	16
<b>V. La distribution des sous-types de <i>Blastocystis</i> sp. dans la population humaine</b>	20
<b>VI. La distribution des sous-types de <i>Blastocystis</i> sp. chez les animaux et l'évaluation du potentiel zoonotique du parasite</b>	22
<b>VII. Les autres modes de transmission de <i>Blastocystis</i> sp.</b>	26
<b>VIII. Des données génomiques récentes concernant <i>Blastocystis</i> sp.</b>	28
VIII.1. Quelques généralités sur le génome nucléaire	29
VIII.2. Le génome mitochondrial	30
<b>IX. Les molécules et mécanismes impliqués dans la pathogénicité de <i>Blastocystis</i> sp.</b>	30

# SOMMAIRE

---

IX.1. La prédiction de protéines impliquées dans les interactions hôte-parasite	30
IX.2. Les données <i>in vitro</i> et l'identification de facteurs de virulence	31
IX.3. Le développement de modèles animaux de blastocystose et la physiopathologie du parasite	33
<b>X. L'impact de <i>Blastocystis</i> sp. en santé humaine et quelques aspects cliniques</b>	<b>35</b>
X.1. Blastocystose et immunodépression	36
X.2. Blastocystose et syndrome du côlon irritable, colite et autres troubles digestifs	36
X.3. Blastocystose et urticaire	38
X.4. Une corrélation entre sous-types de <i>Blastocystis</i> sp. et pathogénicité des isolats ?	39
<b>XI. Les traitements de la blastocystose</b>	<b>40</b>
<b><u>Résultats</u></b>	<b>42</b>
<b>I. Prévalence et biodiversité de <i>Blastocystis</i> sp. chez l'homme</b>	<b>42</b>
I.1. Analyse de la population totale au Liban	42
I.1.1. Introduction	42
I.1.2. Résultats	42
I.1.3. Conclusions	43
I.2. Analyse d'une population de patients diarrhéiques au Liban	44
I.2.1. Introduction	44
I.2.2. Matériels et méthodes	44
I.2.3. Résultats	47
I.2.4. Conclusions	48
I.3. Analyse d'une population d'écoliers au Liban	50
I.3.1. Introduction	50
I.3.2. Matériels et méthodes	50
I.3.3. Résultats	51
I.3.4. Conclusions	53
I.4. Analyse d'une population d'enfants au Sénégal	54

# SOMMAIRE

---

<b>I.4.1. Introduction</b>	54
<b>I.4.2. Résultats</b>	54
<b>I.4.3. Conclusions</b>	55
<b>I.5. Analyse de la population totale en France</b>	56
<b>I.5.1. Introduction</b>	56
<b>I.5.2. Matériels et méthodes et résultats</b>	56
<b>I.5.3. Conclusions</b>	76
<b>II. Facteurs de risque de transmission de <i>Blastocystis</i> sp. à l'homme</b>	77
<b>II.1. Analyse des sources de transmission animales et environnementales au Liban</b>	77
<b>II.1.1. Introduction</b>	77
<b>II.1.2. Matériels et méthodes</b>	77
<b>II.1.3. Résultats</b>	80
<b>II.1.4. Conclusions</b>	81
<b>II.2. Prévalence du parasite chez les animaux du zoo de La Palmyre en France</b>	83
<b>II.2.1. Introduction</b>	83
<b>II.2.2. Matériels et méthodes</b>	83
<b>II.2.3. Résultats</b>	85
<b>II.2.4. Conclusions</b>	86
<b>II.3. Prévalence du parasite dans une population de chiens en France</b>	88
<b>II.2.1. Introduction</b>	88
<b>II.2.2. Matériels et méthodes</b>	88
<b>II.2.3. Résultats</b>	89
<b>II.2.4. Conclusions</b>	89
<b>III. Pathogénicité de <i>Blastocystis</i> sp.</b>	91
<b>III.1. Etude d'un cas clinique d'appendicite</b>	91
<b>III.1.1. Introduction</b>	91
<b>III.1.2. Résultats</b>	91
<b>III.1.3. Conclusions</b>	91

# SOMMAIRE

---

<b><u>Discussion</u></b>	93
<b><u>Conclusion et perspectives</u></b>	108
<b><u>Références bibliographiques</u></b>	111
<b><u>Annexes</u></b>	

# *Introduction*

---

# INTRODUCTION

---

Les maladies émergentes ou ré-émergentes causées par certains eucaryotes pathogènes comme les protozoaires, constituent actuellement un des grands enjeux de santé publique. L'un de ces protozoaires, *Blastocystis* sp., colonise le tube digestif de l'homme et de nombreux animaux et est à ce jour le parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé dans les selles humaines. En effet, sa prévalence peut atteindre les 20% dans les pays développés et largement dépasser les 50% dans les pays en développement (Tan 2008 ; Tan et al. 2010 ; Clark et al. 2013). Cette différence de prévalence entre ces pays peut essentiellement s'expliquer par des conditions d'hygiène plus précaires puisque la voie oro-fécale est considérée comme la principale voie de transmission de ce parasite. Une telle prévalence de *Blastocystis* sp. dans la population humaine à travers le monde pose donc naturellement la question de l'impact réel de ce parasite en santé publique.

Depuis maintenant plus d'une dizaine d'années, un intérêt croissant s'est porté sur ce parasite. Ceci s'est traduit entre autres par la création récente de la *Blastocystis* Research Foundation aux Etats-Unis (<http://www.bhomcenter.org/>), par l'ajout par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de *Blastocystis* sp. sur la liste des parasites d'origine hydrique (WHO 2008) et par l'augmentation significative du nombre annuel de publications portant sur ce parasite. La pathogénicité de *Blastocystis* sp. est longtemps restée controversée mais l'accumulation récente de données génomiques et épidémiologiques couplées à celles d'études *in vivo* et *in vitro* et de cas cliniques indique que l'infection à *Blastocystis* sp. est associée à une variété de troubles gastro-intestinaux (Tan 2008 ; Tan et al. 2010 ; Clark et al. 2013). De plus, ce parasite pourrait jouer un rôle majeur dans une pathologie intestinale chronique fréquente dans les pays industrialisés comme le Syndrome du Côlon Irritable ou IBS, dans l'apparition de lésions cutanées comme l'urticaire (Poirier et al. 2012 ; Roberts et al. 2014) et serait très fréquent chez les patients immunodéprimés en faisant un parasite opportuniste de premier plan (Marcos et Gotuzzo 2013). D'autre part, une considérable hétérogénéité moléculaire des isolats de *Blastocystis* sp. trouvés chez l'homme comme chez l'animal a été mise en évidence avec l'identification d'au moins 17 sous-types (STs) différents notés ST1 à ST17 (Alfellani et al. 2013a). Chacun de ces STs pourrait représenter une espèce si on tient compte des distances évolutives les séparant dans un arbre phylogénétique et présente une spécificité d'hôte très variable. Une corrélation éventuelle entre ST et pathogénicité des isolats a été proposée par de nombreux auteurs mais cette hypothèse reste à confirmer.

Malgré des impacts socio-économiques et en santé publique majeurs, cette parasitose reste encore trop souvent négligée par les autorités sanitaires. Aussi une meilleure



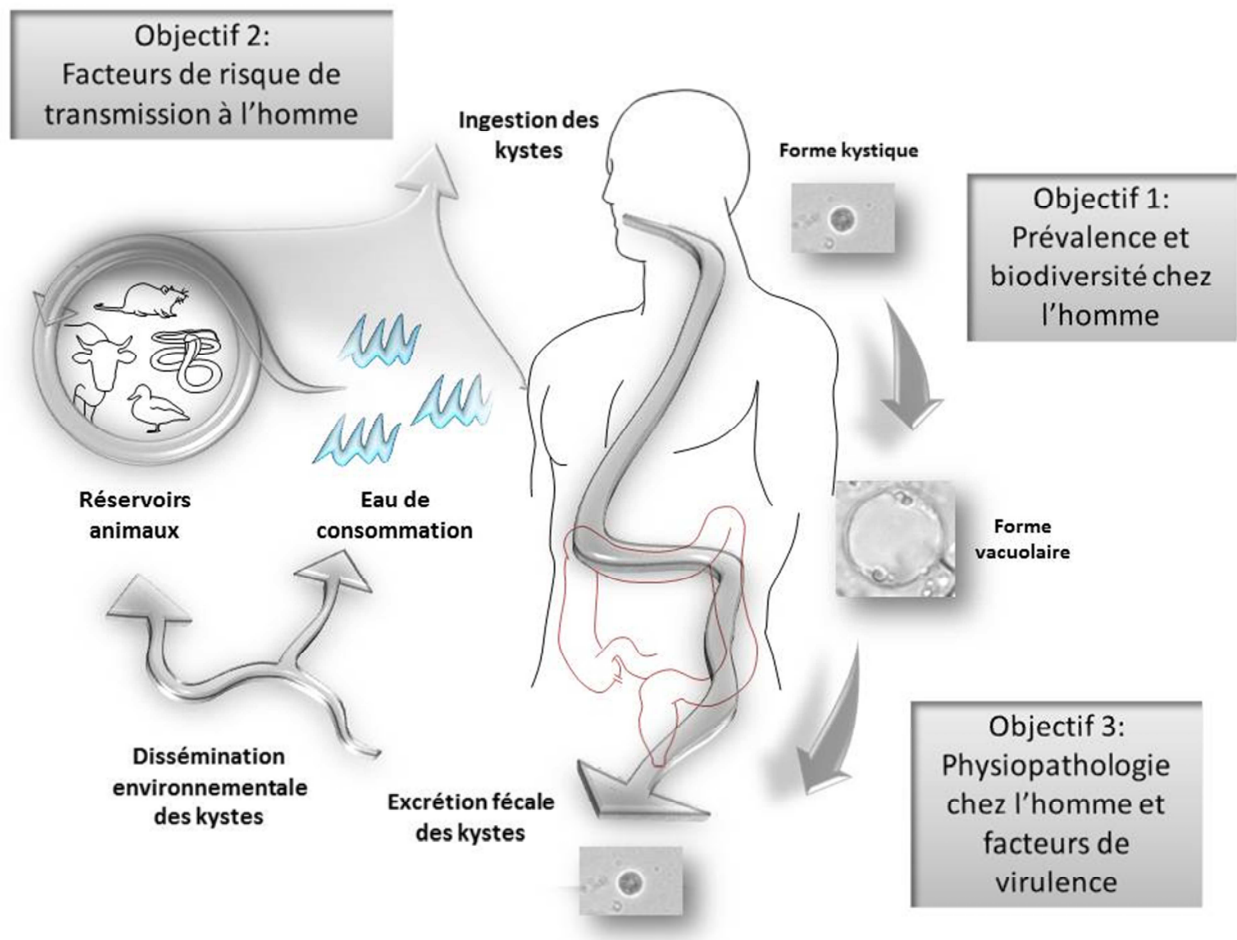
## INTRODUCTION

---

connaissance i) de la prévalence et de la biodiversité du parasite chez l'homme, ii) des facteurs de risque de transmission de celui-ci à l'homme et iii) de sa physiopathologie et des facteurs de virulence impliqués devient indispensable afin de pouvoir définir des stratégies de prévention, de contrôle et de lutte contre cette parasitose. Cela résume les principaux objectifs de l'équipe BDPEE (**Figure 1**) dans lesquels se sont parfaitement intégrées les activités de recherche développées durant ma thèse.

Dans le cadre de mes travaux et à travers de fructueuses collaborations, j'ai eu l'opportunité de pouvoir i) déterminer la prévalence de *Blastocystis* sp. et la distribution des STs dans plusieurs cohortes d'individus de différents pays tels que le Liban, la France et le Sénégal, pays pour lesquels les données épidémiologiques concernant ce parasite étaient limitées voire inexistantes, ii) rechercher quand cela était possible une éventuelle corrélation entre STs de *Blastocystis* sp. et pathogénicité en combinant données moléculaires et données cliniques des individus inclus dans ces études et mettre en évidence d'éventuels facteurs de risque de transmission, iii) identifier et sous-typer les isolats de *Blastocystis* sp. circulant dans les populations animales et dans l'environnement afin de traquer les sources de contamination potentielles pour l'homme et iv) clarifier la physiopathologie de ce parasite à travers l'étude d'un cas clinique d'appendicite à *Blastocystis* sp. en relation probable avec une épidémie familiale d'origine hydrique.

L'ensemble de mes résultats est présenté en 3 chapitres : 1) prévalence et biodiversité de *Blastocystis* sp. chez l'homme, 2) facteurs de risque de transmission de *Blastocystis* sp. à l'homme et 3) pathogénicité de *Blastocystis* sp. Cette présentation est en corrélation avec les 3 grands axes de recherches de l'équipe BDPEE concernant ce parasite.



**Figure 1:** Objectifs poursuivis par l'équipe BDPEE visant à une meilleure connaissance de l'épidémiologie moléculaire, de la transmission et de la pathogénicité du protiste parasite *Blastocystis* sp. Les résultats obtenus durant ma thèse s'intègrent parfaitement dans ces 3 axes majeurs de recherche et seront présentés selon ce schéma directeur.

# *Analyse Bibliographique*

---

## I. La biologie de *Blastocystis* sp.

### I.1. Un organisme polymorphe

*Blastocystis* sp. est un unicellulaire eucaryote strictement anaérobie puisque très sensible à toute exposition à l'air (Tan 2008). La morphologie de ce parasite a été largement étudiée en microscopie optique et électronique à transmission ou à balayage en observant des échantillons de selles fraîches et de cultures axéniques ou xéniques (Zierdt 1973, 1988, 1991; Zierdt et Tan 1976 ; Matsumoto et al. 1987 ; Melhorn 1988 ; Yoshikawa et al. 1988, 1995, 2007 ; Dunn et al. 1989 ; Stenzel et Boreham 1991, 1996; Teow et al. 1992; Boreham et Stenzel 1993 ; Stenzel et al. 1994, 1995, 1997 ; Yoshikawa et Hayakawa 1996a,b ; Suresh et al. 1994, 1997, 2009 ; Moe et al. 1996 ; Zaman et al. 1997, 1998, 1999 ; Chen et al. 1999 ; Pakandl 1999 ; Vdovenko 2000 ; Tan et al. 2002 ; Tan 2004, 2008; Tan et Suresh 2006a,b ; Zhang et al. 2012). La caractéristique majeure de cet organisme est son polymorphisme se traduisant par une variation importante de sa taille et par l'existence de différentes formes allant d'une forme sphérique à une forme amiboïde. Par conséquent, cette multitude de formes différentes rend difficile l'assignation d'une forme spécifique au parasite.

Quatre formes majeures de *Blastocystis* sp. ont été décrites dans les selles ou en culture *in vitro*: vacuolaire, kystique, granulaire et amiboïde (Tan 2004, 2008) (**Figures 2 et 3**). En général, les formes vacuolaires et à un moindre degré, les formes granulaires sont prédominantes dans les échantillons de selles fraîches et en culture *in vitro*. La forme amiboïde est quant à elle plus fréquemment observée dans les échantillons de culture *in vitro* que dans les selles fraîches même si une excrétion prédominante de la forme amiboïde a été rapportée dans les selles de quelques patients symptomatiques (Tan et Suresh 2006b). La forme kystique est principalement observée dans les échantillons de selles et rarement en culture *in vitro*.

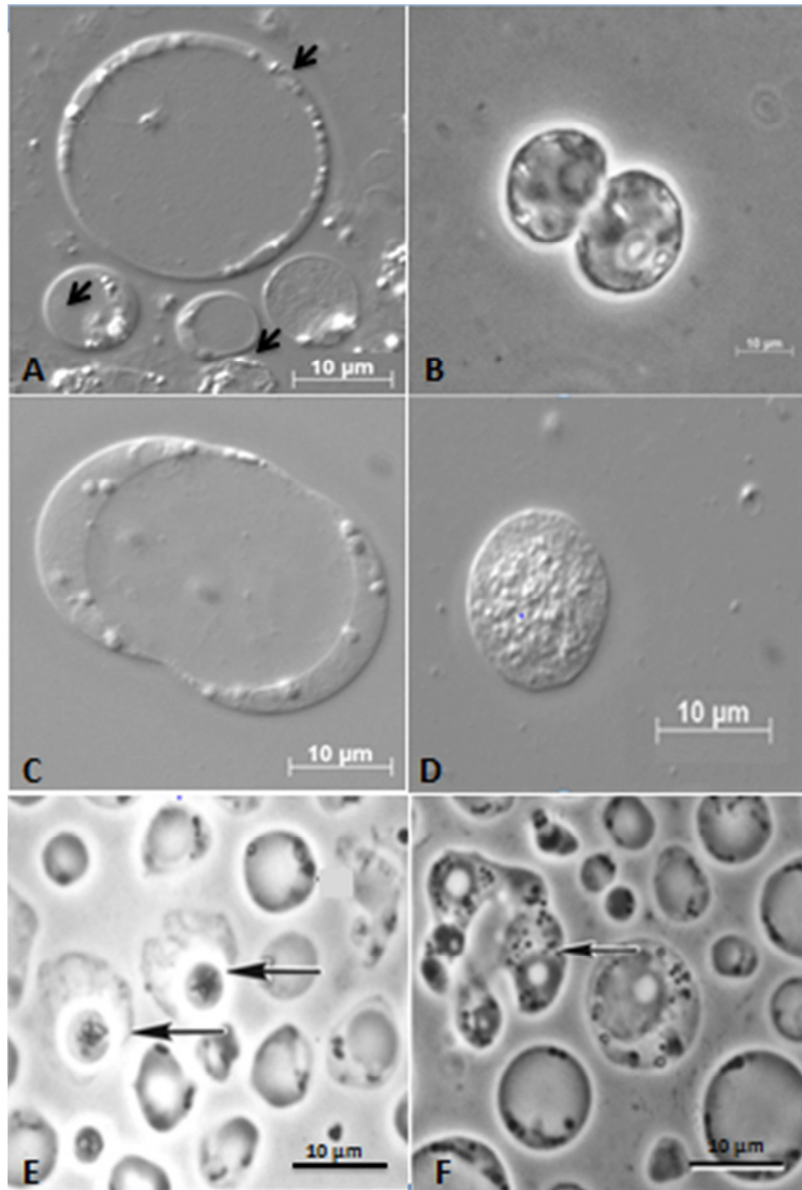
Pour certaines de ces formes, on note la présence d'organites particuliers ressemblant à des mitochondries, ce qui peut paraître surprenant chez un organisme anaérobie. Ces organites appelés MLO pour « mitochondria-like organelle » ont une forme sphérique ou ovale avec un diamètre de 1 à 3  $\mu\text{m}$ . Leur nombre est variable selon les isolats ou même selon les formes d'un même isolat. Ils sont entourés d'une double membrane présentant des crêtes et leur matrice est dense aux électrons. Différentes colorations au DAPI et au MitoLight ont confirmé que cet organite possédait un génome et ont mis en évidence un potentiel

transmembranaire (Nasirudeen et Tan 2004) (**Figure 4**). L'appareil de Golgi de *Blastocystis* sp. se trouve toujours près du noyau et de petits granules sécrétoires denses aux électrons sont souvent observés près de cet appareil. La fonction générale de cet organite est la synthèse de glucides qui a été démontrée par histochimie au niveau ultrastructural (Yoshikawa et al. 1995).

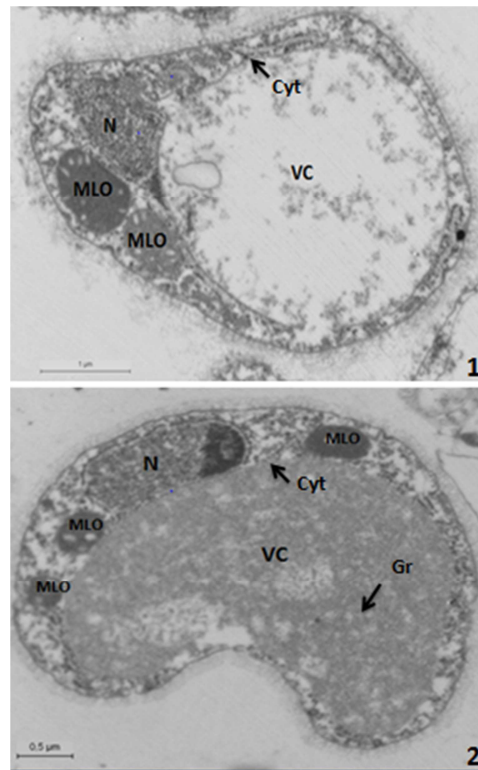
### I.1.1. La forme vacuolaire

Elle représente la forme la plus aisément identifiable et la plus fréquente dans les selles ou en culture *in vitro* et permet l'identification de l'organisme par examen microscopique des selles dans le cadre du diagnostic. Elle est arrondie ou ovalaire et son diamètre moyen est généralement compris entre 4 et 150  $\mu\text{m}$ . Ces variations de taille sont observées entre isolats mais aussi au sein d'un même isolat (Yaicharoen et al. 2006). Dunn et al. (1989) ont ainsi mis en évidence, à partir de 10 isolats humains, une variation de taille allant de 4 à 63  $\mu\text{m}$ . La forme vacuolaire peut parfois atteindre 200  $\mu\text{m}$  de diamètre en culture axénique (Stenzel et Boreham 1996). Cette forme possède une large vacuole centrale occupant 90% du volume de la cellule, ce qui pousse les organites et le cytoplasme dans un anneau périphérique mince, difficile à visualiser en microscopie optique. La vacuole centrale peut apparaître vide ou contenant un fin matériel floconneux. Elle contiendrait des carbohydrates, des lipides et des protéases ce qui évoque un rôle de stockage pour cet organite (Yoshikawa et al. 1995; Puthia et al. 2008 ; Tan 2008). En microscopie électronique à transmission, cette vacuole apparaît claire aux électrons ou présente un aspect finement granuleux distribué de manière irrégulière (**Figure 3**) (Stenzel et Boreham 1996; Tan 2008). L'anneau cytoplasmique renferme les noyaux en nombre variable, un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique, des microtubules et des MLOs. Cette forme est souvent entourée d'un manteau de surface, appelé couche fibrillaire ou d'une capsule d'épaisseur variable pouvant être apparentée à un glycocalyx (Lanuza et al. 1996). Certaines cellules en sont pourtant complètement dépourvues *in vitro* (Dunn et al. 1989). Le rôle possible de ce glycocalyx serait de piéger des bactéries, en vue d'un apport de nutriments pour la croissance de la cellule (Zaman et al. 1999).

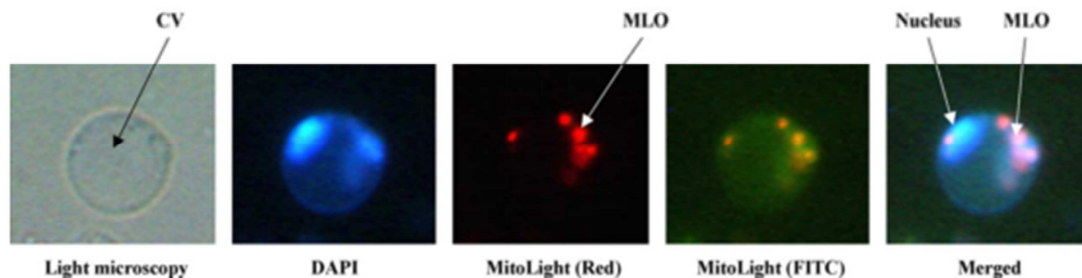
### I.1.2. La forme granulaire



**Figure 2:** Observations en microscopie optique et en contraste de phase des différentes formes de *Blastocystis* sp. en culture axénique. (A) Formes vacuolaires de différentes tailles (Cliché D. El Safadi) ; (B) Phase de division binaire de la forme vacuolaire (Cliché D. El Safadi) ; (C) Forme vacuolaire d'une culture axénique présentant plus de 10 noyaux à la périphérie de la cellule (Cliché D. El Safadi) ; (D) Forme granulaire de *Blastocystis* sp. (Cliché D. El Safadi) ; (E) Formes kystiques de *Blastocystis* sp. indiquées par des flèches (Tan 2008) ; (F) Forme amiboïde indiquée par une flèche et présentant des pseudopodes (Tan 2008).



**Figure 3:** Observation en microscopie électronique à transmission d'une forme vacuolaire (1) et d'une forme granulaire (2) de *Blastocystis* sp. (Clichés D. El Safadi). Ces formes sont caractérisées par une large vacuole centrale (VC), entourée par une fine bande de cytoplasme (Cyt) où se situent le noyau (N) et des organites appelés MLO pour « Mitochondrion-Like Organelles ». La vacuole centrale de la forme granulaire est remplie de petits granules (Gr).



**Figure 4:** Photographie en microscopie optique d'une forme vacuolaire de *Blastocystis* sp. ST7 en contraste de phase et après coloration au DAPI et au MitoLight (Nasirudeen et Tan 2004). Les colorations au DAPI et au MitoLight mettent en évidence la présence d'ADN et d'un potentiel transmembranaire dans les MLOs.

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

La forme granulaire de *Blastocystis* sp. est morphologiquement similaire à la forme vacuolaire, mais elle est caractérisée par la présence de granules très hétérogènes au sein de la vacuole centrale. Sa taille est légèrement plus petite que celle de la forme vacuolaire, et varie de 3 à 80 µm. Les granules ont des aspects hétérogènes et ont été décrits comme de petites vésicules ou des gouttes lipidiques (Dunn et al. 1989) (**Figure 3**). La forme granulaire est principalement trouvée dans des cultures relativement anciennes ou en présence d'antibiotiques. Pour certains auteurs, elle serait plutôt une forme vacuolaire au contenu cellulaire particulier plutôt qu'un stade parasitaire distinct (Boreham et Stenzel 1993 ; Stenzel et Boreham 1996).

### I.1.3. La forme kystique

La difficulté majeure dans l'observation de kystes de *Blastocystis* sp. dans les selles est essentiellement liée à leur forme et à leur petite taille qui varie généralement entre 3 et 5 µm. Ces caractéristiques les rendent quasi indétectables par un examen microscopique classique. La microscopie électronique pour des isolats humains et animaux montrent que cette forme est entourée d'une paroi épaisse composée de plusieurs couches avec un à quatre noyaux selon les isolats. La vacuole centrale n'existe pas chez cette forme alors qu'une grande masse de granules de glycogène a été rapportée dans le cytoplasme d'un isolat de reptile (Yoshikawa et al. 2003a). C'est la forme de résistance du parasite face aux situations défavorables telles que l'exposition à l'eau, à l'air ou aux fortes variations de température. Ce kyste peut par exemple survivre 19 jours dans l'eau à température ambiante (Moe et al. 1996) et est résistant aux méthodes de désinfection de l'eau les plus courantes comme la chlorination ou l'ozonation (Moe et al. 1996 ; Zaki et al. 1996 ; Khalifa et al. 2001). Des études d'infections expérimentales de rats (Hussein et al. 2008; Iguchi et al. 2007; Yoshikawa et al. 2004a), de souris (Moe et al. 1997) et d'oiseaux (Tanizaki et al. 2005 ; Iguchi et al. 2007) par des kystes de *Blastocystis* sp. ont confirmé que ce stade parasitaire était la principale forme de transmission du parasite. Cette forme constitue donc la forme de résistance et de dissémination du parasite dans l'environnement via la voie oro-fécale (Yoshikawa et al. 2004a ; Iguchi et al. 2007).

### I.1.4. La forme amiboïde



La forme amiboïde est très rarement observée, et les descriptions morphologiques réalisées sont souvent contradictoires. Cette forme a été décrite pour la première fois dans les selles liquides d'un patient diarrhéique qui est finalement décédé d'une pneumonie (Zierdt et Tan 1976). La forme amiboïde a un diamètre de 3 à 8  $\mu\text{m}$  et possède une forme irrégulière avec des pseudopodes. De plus, la vacuole centrale, les appareils de Golgi et les MLOs seraient absents dans cette forme. Certains chercheurs suggèrent qu'elle constituerait une forme intermédiaire entre la forme vacuolaire et la forme kystique. Des études ultra-structurales ont mis en évidence la présence de bactéries dans des vacuoles pouvant correspondre à des lysosomes (Stenzel et Boreham 1996), proposant ainsi un rôle nutritif de cette forme (Suresh et al. 1994 ; Singh et al. 1995). D'autres études décrivent ces formes avec une large vacuole centrale ou plusieurs petites vacuoles dans le cytoplasme ainsi qu'un ou deux pseudopodes (Tan et al. 1996a; Tan et Suresh 2006a). Ces formes amiboïdes, cultivables sur milieu gélosé pourraient aussi représenter les formes pathogènes du parasite car elles ont été observées par certains auteurs dans les selles de patients diarrhéiques (Tan et Suresh 2006a,b ; Katsarou-Katsari et al. 2008 ; Vassalos et al. 2010 ; Rajamanikam et Govind 2013). Cependant, cette hypothèse reste peu probable du fait de la rareté de leur observation. Pourtant, une étude a récemment montré une corrélation entre le pourcentage de formes amiboïdes dans les cultures d'isolats symptomatiques et l'activité protéase observée dans les lysats cellulaires de parasites (Rajamanikam et Govind 2013). Or les protéases de *Blastocystis* sp. sont considérées comme des facteurs de virulence potentiels (Puthia et al. 2005, 2008 ; Mirza et Tan 2009 ; Wawrzyniak et al. 2012).

### **I.1.5. Les autres formes**

D'autres formes mineures du parasite ont pu être ponctuellement décrites dans des selles fraîches comme les formes multi-vacuolaires ou avacuolaires (Zierdt et Tan 1976 ; Stenzel et al. 1991 ; Boreham et Stenzel 1993; Zhang et al. 2012). A ce jour, il est impossible de se fixer sur l'existence réelle de ces formes et leur rôle éventuel car elles pourraient représenter des formes vacuolaires dégénérées.

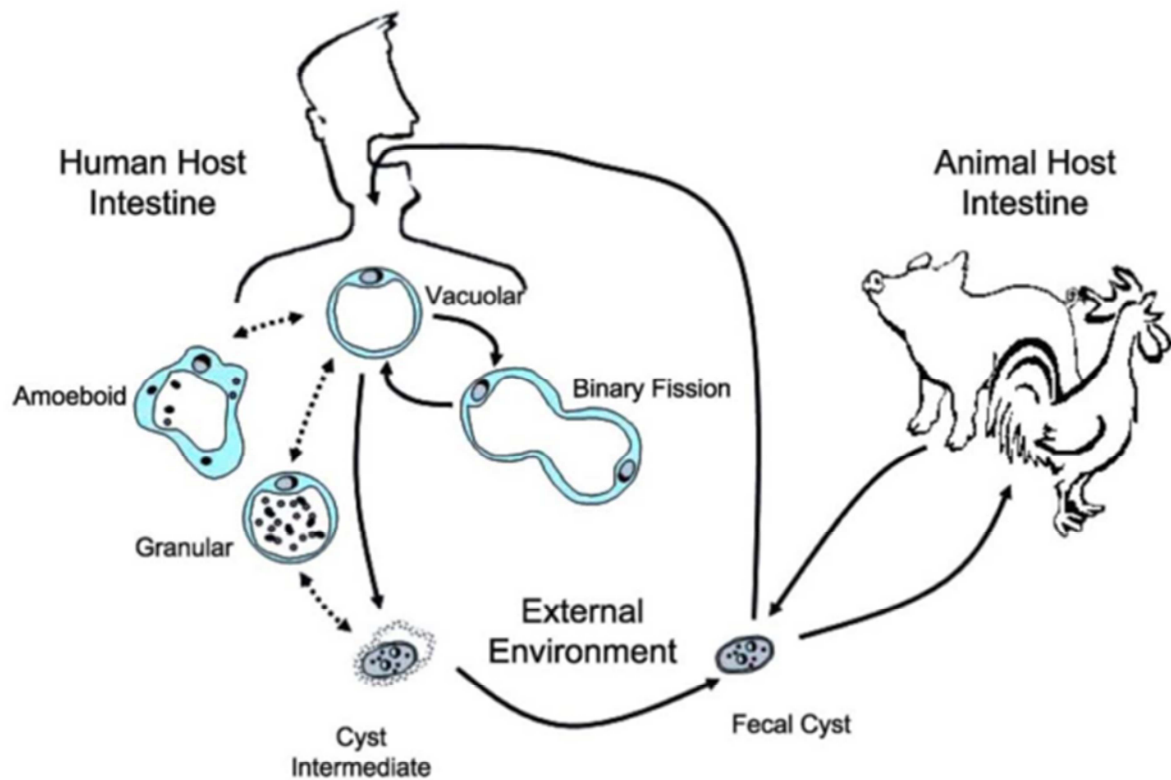
### **I.2. Une reproduction et un cycle biologique encore hypothétiques**

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

La fission binaire (simple séparation d'une cellule mère en deux cellules filles de même taille) a été longtemps le seul mode de reproduction accepté pour *Blastocystis* sp. (Matsumoto et al. 1987; Dunn et al. 1989; Boreham et Stenzel 1993 ; Singh et al. 1995 ; Stenzel et Boreham 1996; Moe et al. 1996; Zaman 1997 ; Tan et Stenzel 2003) (**Figure 2**). Récemment, en se basant sur des observations ultrastructurales, un mode de division par plasmotomie a été proposé (Govind et al. 2002; Tan et Suresh 2007 ; Zhang et al. 2007, 2012). Pour simplifier, 2 à 3 progénètes de petite taille sont issus d'une cellule mère après division du noyau et « bourgeonnement ». Un processus de schyzogonie (cellule mère géante contenant un nombre variable de cellules filles) a aussi été observé (Zhang et al. 2007). Des études ultérieures sont indispensables pour confirmer l'existence de ces derniers modes de reproduction chez *Blastocystis* sp. En effet, ceux-ci pourraient être ponctuels et liés à des conditions de stress ou refléter des anomalies cellulaires aboutissant à des organismes non viables.

Sur la base des travaux publiés sur la morphologie des différentes formes de *Blastocystis* sp. et les modes potentiels de division du parasite, plusieurs cycles biologiques hypothétiques ont été proposés (Zierdt 1973 ; Boreham et Stenzel 1993; Singh et al. 1995; Stenzel et Boreham, 1996; Tan 2004, 2008). En 1995, Singh et al. ont suggéré un cycle de transmission externe avec une forme vacuolaire se différenciant ensuite en forme amiboïde puis en pré-kyste. A ce stade se produirait une schizogonie aboutissant à des kystes à coque épaisse dont la rupture donnerait des cellules filles de forme vacuolaire pouvant infecter l'hôte. Du point de vue de Stenzel et Boreham (1996), la division binaire est le seul mode de reproduction démontré pour *Blastocystis* sp. Ainsi la forme infectante serait la forme kystique, qui se différencierait en une forme avacuolaire, puis multi-vacuolaire suite à son passage dans l'intestin de l'hôte. La forme vacuolaire serait obtenue uniquement en culture et la vacuole centrale correspondrait à une fusion des multiples petites vacuoles. Plus récemment, le cycle de vie proposé par Tan (2004, 2008) suggère que l'infection est initiée lorsque le kyste de *Blastocystis* sp. est ingéré par un hôte humain ou animal. Les kystes se transforment alors en formes vacuolaires au niveau de l'intestin qui vont ensuite se diviser par fission binaire. Certaines formes vacuolaires vont s'enkyster, conduisant à l'apparition de kystes dans les selles, qui pourront à leur tour contaminer un nouvel ou le même hôte (**Figure 5**). Le rôle éventuel des formes amiboïdes et granulaires reste cependant à clarifier. Ce cycle ne tient pas compte des autres modes de reproduction observés en microscopie, ceux-ci étant jugés comme des artefacts par l'auteur.



**Figure 5 :** Cycle biologique proposé pour *Blastocystis* sp. (Tan 2004, 2008).

Les kystes de *Blastocystis* sp. ingérés par l'hôte se développent en formes vacuolaires dans l'intestin qui vont se multiplier par fission binaire. Certaines formes vacuolaires vont ensuite redonner des kystes qui seront disséminés dans l'environnement par l'intermédiaire des fèces. Le développement des autres formes étant peu connu, celles-ci sont représentées par des flèches en pointillés.

### II. La taxonomie et la diversité génétique de *Blastocystis* sp.

#### II.1. Sa découverte et sa classification au sein des eucaryotes

La taxonomie de *Blastocystis* sp. est longtemps restée un challenge pour de nombreux scientifiques. Sa découverte remonte au début du XXème siècle avec sa première description par Alexeieff (1910, 1911) qui l'a considéré comme un nouveau genre d'Ascomycètes (champignons) voisins des levures et lui a donné le nom *Blastocystis enterocola*. En 1912, Brumpt remplace *enterocola* par *hominis* pour les organismes retrouvés dans les selles humaines. Sur la base de ces études, *Blastocystis* sp. a été rapproché des levures en raison de son importante variation de taille, son absence d'organe locomoteur et son mode de division par fission binaire qui peut être facilement confondu avec un mode de division par bourgeonnement. Pourtant, en 1967, Zierdt va démontrer pour la première fois, en se basant sur des critères morphologiques et physiologiques, que ce microorganisme est un protozoaire. En effet, il note l'absence de croissance de *Blastocystis* sp. sur des milieux fongiques, sa sensibilité à des drogues utilisées contre les protozoaires comme le métronidazole et sa résistance aux fongicides (**Tableau 1**). En 1976, sur la base de nouvelles observations morphologiques, *Blastocystis* sp. est transféré dans le sous-phylum des Sporozoaires (Zierdt et Tan 1976). Dix ans plus tard, Zierdt propose d'englober *Blastocystis* sp. au sein du groupe des Sarcodina en raison de sa localisation exclusivement extracellulaire et de l'absence de pôle apical (Zierdt et al. 1988; Zierdt 1991).

L'avancée des techniques moléculaires reposant sur l'analyse et la comparaison des séquences de certains gènes va rapidement permettre de clarifier les relations phylogénétiques du genre *Blastocystis*. Ainsi, la comparaison de la séquence partielle du gène codant l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (ARNr 18S) de *B. hominis* (nom d'espèce utilisé pour identifier un isolat d'origine humaine) avec celles d'autres eucaryotes a d'abord montré que ce parasite n'appartenait pas aux groupes des levures (*Saccharomyces*), des champignons (*Neurospora*), des sporozoaires (*Sarcocystis* et *Toxoplasma*) ou des sarcodines (*Naegleria*, *Acanthamoeba* et *Dictyostelium*) (Johnson et al. 1989). En 1993, Jiang et He ont donc proposé de créer pour ce microorganisme le nouveau sous-phylum *Blastocysta*, incluant la classe *Blastocystea*, l'ordre *Blastocystida*, la famille *Blastocystidae* et le genre *Blastocystis* avec *Blastocystis hominis* comme espèce type. Mais c'est Silberman et al. (1996) qui furent les premiers à intégrer le genre *Blastocystis* au phylum des Straménopiles en se basant sur

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

l'analyse phylogénétique de la séquence complète du gène de l'ARNr 18S de deux isolats humain et murin du parasite (**Figure 6**). Ce groupe complexe des Straménopiles avait été créé au préalable par Cavalier-Smith (1986) et regroupait à la fois des organismes unicellulaires et pluricellulaires, hétérotrophes ou photosynthétiques qu'ils soient libres comme les diatomées et les algues brunes ou parasites comme les Oomycètes (**Figure 7**). Ceux-ci sont tous caractérisés entre autres par la présence, à un moment de leur cycle de vie, d'une cellule à deux flagelles, dont l'un porte des mastigonèmes (fines digitations de la membrane du flagelle) ce qui n'est pourtant pas le cas de *Blastocystis* sp.

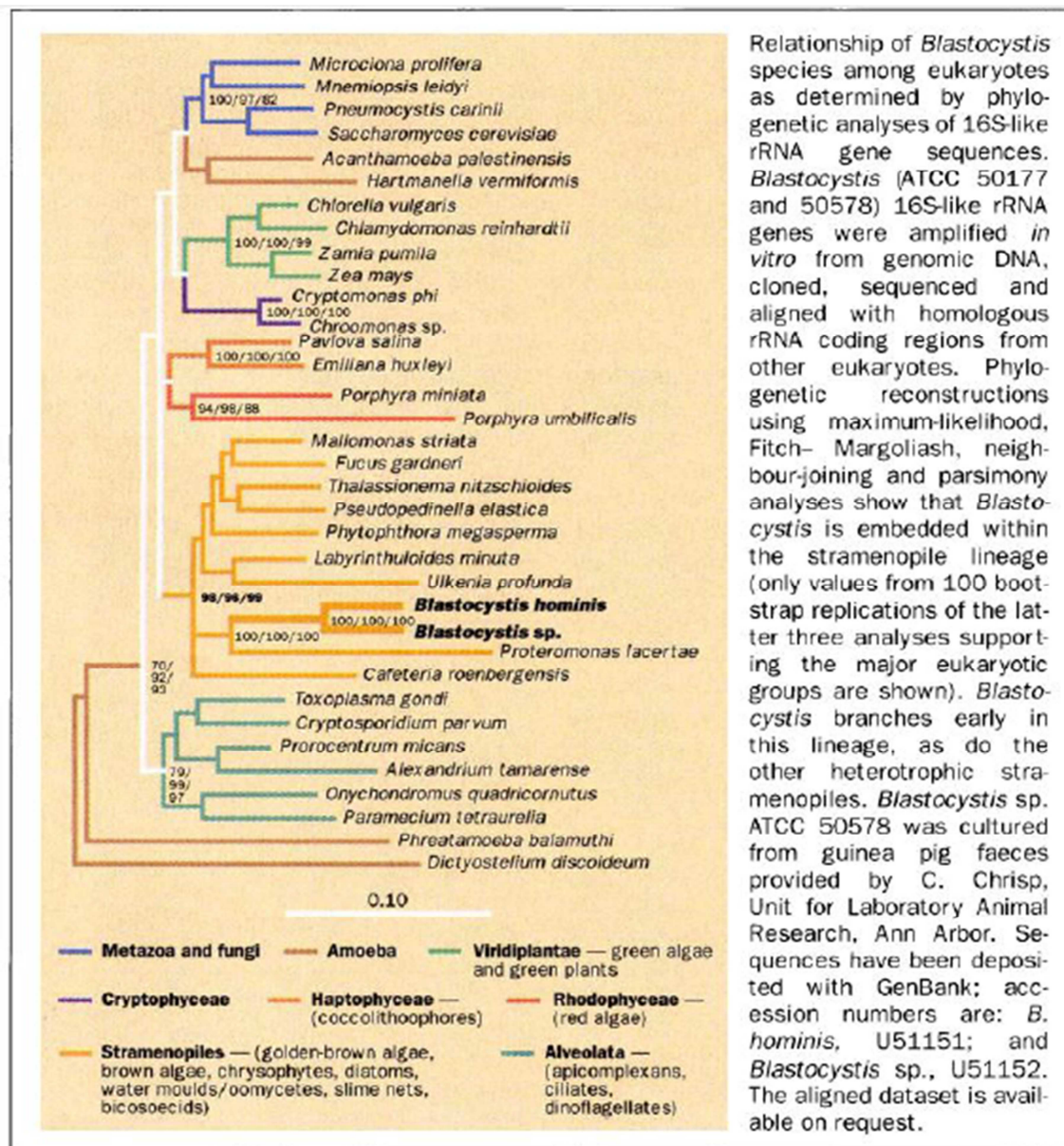
Dans la foulée, d'autres auteurs ont cherché à positionner *Blastocystis* sp. dans l'arbre des eucaryotes en se basant sur les séquences d'un autre indicateur comme le facteur d'élongation 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Avec un échantillonnage d'espèces encore limité, Nakamura et al. (1996) n'ont pas pu résoudre la position de *Blastocystis* sp. Par contre, sur la base du même indicateur, Ho et al. (2000) proposent une relation de parenté entre *Blastocystis* sp. et l'amibe *Entamoeba* et donc un regroupement de ces deux parasites dans le groupe des Sarcodines. Cependant, cette dernière analyse n'englobait aucune séquence de Straménopiles et ne pouvait donc pas être sérieusement prise en considération. D'ailleurs, de nouvelles analyses basées sur les séquences des gènes codant la Heat Shock Protein (Hsp) 70 cytoplasmique, l'EF-2, ou la sous-unité B de l'ATPase vacuolaire confirmaient l'appartenance de *Blastocystis* sp. au groupe des Straménopiles (Arisue et al. 2002). Des résultats similaires ont été observés dans d'autres phylogénies basées sur les séquences du gène de l'ARNr 5.8S et des Internal Transcribed Spacer (ITS) 1 et 2 (Hoevers et Snowden 2005). Dans ces derniers arbres, *Blastocystis* sp. était phylogénétiquement proche du Straménopile *Proteromonas lacertae*, un endosymbionte flagellé de l'intestin de lézards et d'amphibiens ce qui fut ensuite confirmé par la comparaison des séquences du gène codant l'ARNr 18S (Yoshikawa et al. 2007). Ces deux organismes ont en commun de coloniser le tube digestif des vertébrés et de présenter un stade de résistance (kyste) qui est aussi le stade de contamination. Cependant, au contraire de *Proteromonas lacertae*, aucun stade de vie flagellé n'a été décrit chez *Blastocystis* sp. (Tan 2008). A ce jour, *Blastocystis* sp. est le seul Straménopile connu pouvant infecter l'homme ce qui suggère un processus évolutif récent d'adaptation au parasitisme chez ce microorganisme. Plus récemment, des phylogénies des Straménopiles (ou Hétérokontes) ont été reconstruites sur la base de plusieurs indicateurs moléculaires (Riisberg et al. 2009). On note au sein de ce groupe une parfaite dichotomie entre les organismes autotrophes ou photosynthétiques (Ochrophyta) et les organismes hétérotrophes. *Blastocystis* sp. émerge au sein des

Characteristic	Yeast	<i>B. hominis</i>
Strict anaerobe	No	Yes
No growth on fungal or bacteriological media	No	Yes
Growth on media developed for intestinal protozoa	No	Yes
No growth on surface of solid media	No	Yes
Requires presence of bacteria for growth; axenic growth achieved slowly under carefully controlled conditions	No	Yes
Capable of ingesting bacteria and other particulate matter	No	Yes
Cultures die in 2–3 days at 22°C or overnight at 4°C	No	Yes
No growth below 33°C, but cell death at 30°C	No	Yes
Optimal growth at 37°C	No	Yes
Optimal growth at neutral pH	No	Yes
No growth at pH 5.5	No	Yes
Resistant to 400 µg of amphotericin per ml	No	Yes
Sensitive to drugs effective against intestinal protozoa	No	Yes
No cell wall	No	Yes
Reproduction by endodyogony, schizogony, binary fission, and plasmotomy (cutting off) individual <i>B. hominis</i> from the ameba form	No	Yes
No budding	No	Yes
Supports stable bacterial endosymbiont (an obligate mutualism)	No	Yes
Slow-feeding pseudopods	No	Yes
Rapid locomotion pseudopods	No	Yes
Limiting membrane with micropinocytotic vesicles	No	Yes
Membrane-bound CB, a reproductive organelle, formerly called vacuole	No	Yes
Mitochondria in all cells; mitochondria show a general morphology similar to that in other protozoa, with short saccate cristae when in the resting mode	No	Yes

**Tableau 1:** Caractéristiques utilisées pour reclasser *Blastocystis* sp. parmi les protozoaires (Zierdt 1991).

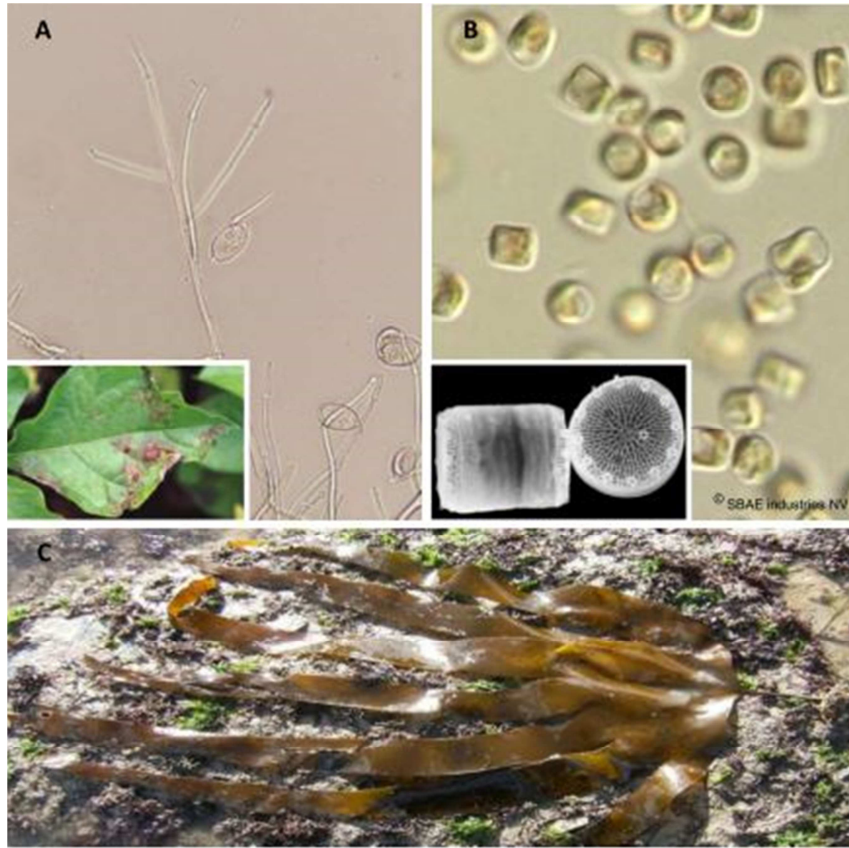
*Blastocystis* sp. ne présente pas les mêmes propriétés physiologiques que les champignons comme le montre cette comparaison avec une levure.





**Figure 6:** Relations de parenté du genre *Blastocystis* avec d'autres eucaryotes basées sur la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 18S (Silberman et al. 1996).

Les séquences des deux isolats de *Blastocystis* (un isolat humain nommé *B. hominis* et un isolat obtenu chez un cochon d'Inde nommé *Blastocystis* sp.) sont très proches l'une de l'autre et ne présentent que 6,4 % de différence. Les valeurs élevées de bootstrap confirment l'émergence du genre *Blastocystis* au sein des Straménopiles.



**Figure 7:** Exemples d'organismes appartenant au groupe des Straménopiles.

Le groupe des Straménopiles englobe des organismes parasites comme l'Oomycète *Phytophthora infestans* (A) qui est un parasite des plantes, mais aussi des organismes libres tels que la diatomée *Thalassiorira pseudonana* (B) et l'algue brune *Laminaria digitata* (C).

Sources des images : (A) <http://www.bioimages.org.uk>, (B) <http://www.sbae-industries.com>, (C) <http://www.sbroscoff.fr>



Straménopiles hétérotrophes dans le groupe des Bigyra. Cette émergence pose alors une question intéressante quant à l'origine des deux gènes d'origine chloroplastique identifiés dans le génome de *Blastocystis* sp. (Denoeud et al. 2011).

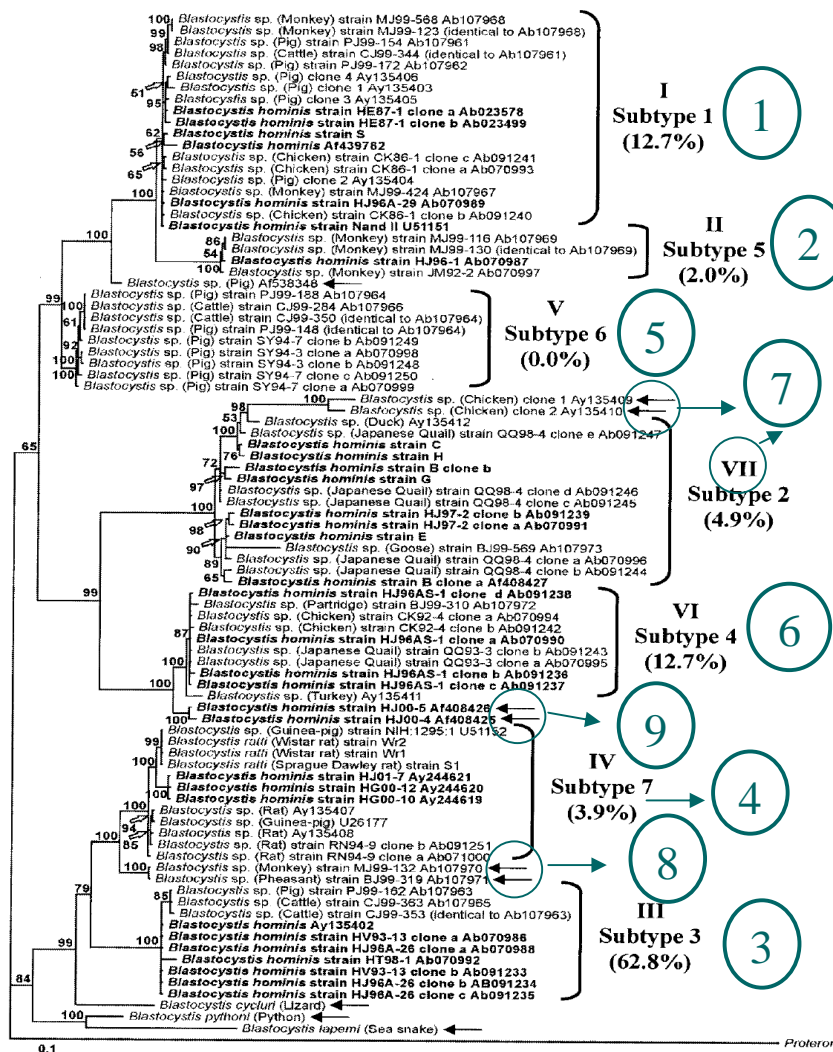
### **II.2. La diversité génétique des isolats et la classification au sein du genre *Blastocystis***

*Blastocystis* sp. a été retrouvé chez l'homme comme chez de très nombreux groupes d'animaux comme les insectes, les reptiles, les oiseaux ou les mammifères (Boreham et Stenzel 1993; Stenzel et Boreham 1996 ; Tan 2004, 2008) (**voir Par. VI**). Cependant, aucune différence morphologique significative n'a été mise en évidence par microscopie photonique ou électronique entre isolats provenant d'hôtes très variés. Pourtant, les premiers travaux d'Upcroft et al. (1989) montrent des différences dans le nombre de bandes chromosomiques obtenues par électrophorèse en champs pulsé pour différents isolats de *B. hominis* ce qui fut aussi confirmé par Carbajal et al. (1997). Par comparaison avec ces derniers profils caryotypiques d'isolats obtenus chez l'homme, cette approche a dans la foulée permis de décrire plusieurs espèces de *Blastocystis* comme *B. lapemi* chez le serpent de mer (Teow et al. 1991), *B. geocheloni* chez la tortue, *B. cycluri* chez l'iguane, *B. pythoni* chez le python (Singh et al. 1996) ou bien encore *B. ratti* chez le rat (Chen et al. 1997). Par contre, Ho et al. (1994) ne mettaient pas en évidence de différences de profils entre plusieurs isolats de *B. hominis*. Ces premières études avaient donc tendance à proposer une forte hétérogénéité moléculaire entre isolats de *Blastocystis* provenant d'hôtes différents.

Cette diversité génétique entre isolats a ensuite été confirmée par Yoshikawa et al. (1996, 1998, 2003b), Init et al. (1999) puis Tan et al. (2006) en utilisant la méthode Random Amplified Polymorphic DNA ou RAPD. Yoshikawa et al. (1998) ont d'ailleurs été les premiers auteurs à mettre en évidence la très forte similarité de profils obtenus pour certains isolats humains et animaux suggérant le potentiel zoonotique du parasite. Cette hétérogénéité moléculaire entre isolats a aussi été confirmée par plusieurs auteurs en utilisant une autre méthode, la Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP basée sur l'amplification du gène codant l'ARNr 18S (Böhm-Gloning et al. 1997 ; Clark 1997 ; Hoevers et al. 2000 ; Kaneda et al. 2001 ; Init et al. 2007 ; Wong et al. 2008 ; Elwakil et Talaat 2009 ; Jantermtor et al. 2013) ou celui codant l'EF-1 $\alpha$  (Ho et al. 2001). A partir de ces profils et selon les études furent alors créés des ribodèmes, des sous-groupes, des sous-types, des génotypes, des clades

ou des elfatypes rendant toute taxonomie et comparaison des isolats extrêmement complexe. Par RFLP, Yoshikawa et al. (2003b) proposèrent l'existence de 7 « clusters » au sein du genre *Blastocystis*, « clusters » qui furent désignés sous-types l'année suivante par ces mêmes auteurs (Yoshikawa et al. 2004b). A travers cette approche moléculaire, Yoshikawa et al. (2004b,c) identifièrent des couples d'amorces utilisables en PCR et spécifiques de chacun de ces « clusters » ou sous-types (sequenced-tagged sites (STS) primers ou STS-PCR). Ces amorces ont été par la suite utilisées par Yan et al. (2006), Li et al. (2007), Yoshikawa et al. (2009) et Jantermort et al. (2013) dans des études épidémiologiques.

Mais ce n'est qu'en 2003 que les premières données de séquences du gène de l'ARNr 18S furent obtenues pour plusieurs isolats humains et animaux (Arisue et al. 2003 ; Noël et al. 2003). Les analyses phylogénétiques en découlant montraient clairement une très grande diversité génétique au sein du genre *Blastocystis*. De plus, certaines séquences d'isolats humains étaient identiques à celles obtenues pour des isolats animaux ce qui confirmait le caractère zoonotique de ce parasite et sa faible spécificité d'hôte. En 2005, Noël et al. (2005) proposèrent dans le cadre d'une très large analyse phylogénétique, l'existence d'au moins 9 sous-types (STs), chacun d'entre eux pouvant représenter une espèce (**Figure 8**). De plus, plusieurs de ces STs étaient clairement capables d'infecter l'homme. Cette dernière phylogénie était basée sur la comparaison des séquences complètes du gène de l'ARNr 18S. Or l'année suivante, Scicluna et al. (2006) démontrèrent qu'un fragment d'environ 600 pb de ce même gène (DNA barcoding) était suffisamment informatif en termes de séquences pour pouvoir assigner un isolat donné à un des 9 STs déterminés auparavant par Noël et al. (2005). La situation restant cependant confuse, Stensvold et al. (2007a) suggérèrent de standardiser la taxonomie du genre *Blastocystis* et de confirmer la création de 9 STs. Pour cela, les auteurs repriront toutes les données obtenues préalablement et proposèrent une corrélation entre cette nouvelle taxonomie et les précédentes désignations de ces STs telles que clade, ribodème, groupe ou cluster (**Tableau 2**). De plus, le taxon *B. hominis* n'étant plus valable puisque non monophylétique dans les analyses phylogénétiques (« espèce » non spécifique de l'homme), les mêmes auteurs proposèrent d'assigner à chaque isolat sous-typé le nom de *Blastocystis* sp. suivi du ST identifié (ex : isolat X = *Blastocystis* sp. ST3). Par la suite, un nouveau ST10 a été identifié chez des primates et des artiodactyles (Stensvold et al. 2009a) puis 5 autres STs supplémentaires (ST11 à ST15) furent caractérisés chez différents hôtes : le ST11 chez les éléphants, le ST12 chez la girafe, le ST13 chez le quokka et le kangourou gris, le ST14 chez les bovins et le ST15 chez les primates (Parkar et al. 2010 ; Fayer et al. 2012 ; Alfellani et al.



**Figure 8:** Phylogénie moléculaire des isolats du genre *Blastocystis* provenant d'hôtes très variés basée sur la comparaison des séquences complètes du gène de l'ARNr 18S (Noël et al. 2005). Les différents STs proposés sont indiqués. Les flèches indiquent des isolats formant des STs additionnels. Les isolats obtenus chez l'homme apparaissent en gras. On note que les séquences de certains isolats humains sont identiques à celles d'isolats animaux confirmant le potentiel zoonotique du parasite et sa faible spécificité d'hôte

(b)

Table 2. Correlation of *Blastocystis* subtype designations and suggestion for consensus terminology

Clade <sup>a</sup>	Subtype <sup>b</sup>	Group and subtype <sup>c</sup>	Subtype <sup>d</sup>	Ribodeme <sup>e,f</sup>	Subgroup <sup>g</sup>	Cluster <sup>h</sup>	Subtype <sup>i</sup>	Consensus
I	I	I/1	1	<b>1, 8<sup>j</sup></b>	III	E	1, 1 variant	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 1
II	II	II/5	5	<b>6</b>	V	C, D	– <sup>k</sup>	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 2
–	X	I-II/1+5 outlier	–	–	–	–	–	Chimaeric sequence
III	III	III/3	3	<b>2, 7, 47<sup>l</sup>, 57</b>	I, II	A	3	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 3
IV	IV	IV/7	7	<b>3</b>	IV	B	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 4
–	IVa	IV/7 outliers	–	–	–	–	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 8
V	V	V/6	6	–	–	–	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 5
VI	VI	VI/4	4	<b>9<sup>j</sup></b>	–	–	4	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 6
–	VIa	VI/4 outliers	–	–	–	–	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 9
VII	VII	VII/2	2	<b>10</b>	VI <sup>m</sup>	–	2	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 7
–	VII	VII/2 outliers	–	–	–	–	–	<i>Blastocystis</i> sp. subtype 7

<sup>a</sup>Clades described by Arisue *et al.* [20] and Yoshikawa *et al.* [26].<sup>b</sup>Subtypes described by Scicluna *et al.* [24].<sup>c</sup>Groups and subtypes described by Noëi *et al.* [7].<sup>d</sup>Subtypes described by Yoshikawa *et al.* [12,30].<sup>e</sup>Ribodemes are groups that share the same SSU-rDNA PCR-RFLP patterns and are described by Clark [4] and Yoshikawa *et al.* [12].<sup>f</sup>Ribodemes in bold are those originally described by Clark [26].<sup>g</sup>Subgroups described by Böhm-Glönning *et al.* [10] on the basis of PCR-RFLP analysis and partial SSU-rDNA sequences.<sup>h</sup>Clusters described by Stensvold *et al.* [25] on the basis of PCR and sequencing analysis of partial SSU-rDNA sequences.<sup>i</sup>Subtypes described by Yoshikawa *et al.* [12] using PCR-STs.<sup>j</sup>Ribodemes 8 and 9 described by Yoshikawa *et al.* [12] differ from those described by Kaneda *et al.* [14].<sup>k</sup>– symbols indicate no equivalent described.<sup>l</sup>Question mark indicates that the subtype equivalence is probable but not proven.<sup>m</sup>Subgroup VI described by Thathaisong *et al.* [18] equals ribodeme 10 described by Yoshikawa *et al.* [12] (K.S.W. Tan, unpublished).

**Tableau 2:** Classification proposée pour le genre *Blastocystis* (Stensvold et al. 2007a).

Les corrélations entre les anciennes désignations et les nouveaux STs sont indiqués.

2013b). Récemment, 2 nouveaux STs (ST16 et ST17) ont été découverts chez les kangourous et le Goundi de l'Atlas (Alfellani et al. 2013a).

### **III. Les méthodes de diagnostic de *Blastocystis* sp. et sa mise en culture**

Plusieurs études et revues traitent de la comparaison des méthodes de détection de *Blastocystis* sp. dans les selles (Stensvold 2007b, 2013a ; Tan 2008 ; Dogruman-Al et al. 2010 ; Poirier et al. 2011 ; Roberts et al. 2011, 2013a ; Stensvold et al. 2012a ; Bart et al. 2013 ; Santos et Rivera 2013 ; Kumarasamy et al. 2014). L'identification du parasite peut se faire i) par observation microscopique directe des selles fraîches précédée d'une éventuelle concentration et suivie d'une coloration, ii) par la mise en culture des selles ou iii) par des approches moléculaires (RFLP, RAPD, STS-PCR, PCR standard, PCR en temps réel ou quantitative, PCR multiplex...). Les comparaisons effectuées entre ces méthodes de détection confirment globalement la plus grande sensibilité des méthodes moléculaires par rapport aux méthodes microscopiques et culturales.

#### **III.1. L'observation microscopique des selles**

Pour l'instant, le diagnostic de *Blastocystis* sp. n'est généralement pas pratiqué en routine dans les laboratoires et hôpitaux puisque nombre de praticiens ne considèrent toujours pas ce microorganisme comme un agent étiologique responsable d'une pathologie. De plus, son polymorphisme rend son diagnostic difficile et nécessite un technicien expérimenté pour pouvoir détecter le parasite par observation microscopique directe des selles. D'ailleurs Bart et al. (2013) indiquent qu'un technicien très entraîné à la recherche du parasite par microscopie réduit considérablement l'écart de sensibilité entre cette approche et une méthode moléculaire. Parfois, la forme vacuolaire classique qui est aisément reconnaissable n'est pas prédominante dans les selles (Stenzel et al. 1991) et la forme kystique de petite taille peut être confondue avec des débris fécaux (Tan 2004). En outre, l'excrétion du parasite par un individu infecté étant irrégulière, il est conseillé d'examiner plusieurs échantillons de selle d'un même patient (Guimaraes 1993 ; Vennila et al. 1999). Récemment, Kumarasamy et al. (2014) ont proposé de réaliser des lavages du côlon et du rectum pour palier à cette dernière difficulté. La détection des formes kystiques du parasite nécessite des étapes de concentration préalables des selles (Zaman et Khan 1994 ; Zaman 1996 ; Becker et al. 2011 ; Koltas et al.

2014), la plus courante étant celle utilisant le formol et l'éther (FECT ou Formol Ethyl acetate Concentration Technique). Cependant, cette méthode n'est pas réellement recommandée en raison de son agressivité pour les formes vacuolaires et de sa faible sensibilité (Suresh et Smith 2004; Stensvold et al. 2006, 2007b). Les échantillons concentrés ou non sont ensuite colorés pour les observations directes à l'aide de lugol, de Giemsa, d'hématoxyline ferrique ou de trichrome, ce dernier colorant étant le plus couramment utilisé (Windsor et al. 2002 ; Saksirisampant et al. 2003 ; Termmathurapoj et al. 2004 ; Stensvold 2007b ; Roberts et al. 2011).

### III.2. La mise en culture des selles

C'est Barret qui, en 1921, a réussi pour la première fois à cultiver *Blastocystis* sp. *in vitro* à 37°C dans un milieu xénique constitué d'une solution saline à 0,5% complémenté de 10% de sérum humain. La croissance du parasite se faisait essentiellement au fond du tube où la concentration d'oxygène était faible. L'utilisation d'un milieu Boeck-Drbohlav pré-réduit à base d'œuf épaissi (Boeck et Drbohlav 1925) a permis la croissance de *Blastocystis* sp. sur un milieu solide ou semi-solide. L'axénisation des échantillons peut ensuite être obtenue à l'aide de cocktails d'antibiotiques variés (Zierdt et Williams 1974 ; Zierdt 1991 ; Teow et al. 1992 ; Chen et al. 1997 ; Lanuza et al. 1997 ; Ng et Tan 1999). Cependant, de nombreux chercheurs n'ont eu que des tentatives d'axénisation infructueuses et ont émis l'hypothèse que dans certaines conditions, les bactéries étaient nécessaires à la survie de l'organisme, sans doute pour l'apport de nutriments au parasite ou en produisant des métabolites d'intérêt (Boreham et Stenzel 1993).

Afin de développer un milieu monophasique, de nombreux milieux et conditions ont été testés, tels que les milieux Diamond's TPS-1, Jones, MEM199, RPMI 1640 et MEM (Tan 2008). Le milieu de Jones (1946) est de loin le milieu le plus utilisé dans la mise en culture d'échantillons de selle de patients dans le cadre d'études épidémiologiques (Leelayoova et al. 2002; Suresh et Smith 2004 ; Termmathurapoj et al. 2004 ; Stensvold et al. 2007b). Cependant, dans le cas d'infections mixtes (présence d'au moins deux isolats de STs différents dans les selles d'un même patient), cette culture *in vitro* en milieu de Jones pourrait favoriser le développement d'un ST par rapport à un autre (Parkar et al. 2007 ; Yan et al. 2007 ; Roberts et al. 2013a) et donc fausser les résultats si cette culture est suivie d'un sous-typage des isolats. D'autre part, il est difficile voire impossible de cultiver certains isolats



dans ce milieu (Parkar et al. 2007; Tan 2008) et de mettre en œuvre cette technique pour de larges cohortes de patients.

Ce milieu est également utilisé dans les premières phases de culture xénique du parasite en vue d'une éventuelle axénisation. Les cultures axéniques, constituées de la forme vacuolaire du parasite, sont maintenues en milieu IMDM ou MEM, additionné de 10% à 30% de sérum de cheval (Ho et al. 1993). Afin de limiter la présence d'oxygène dans le milieu de culture, celui-ci est préalablement pré-réduit en chambre anaérobie pendant 48 h.

D'autres milieux de culture ont également été testés afin d'obtenir les différentes formes du parasite à partir de la forme vacuolaire. La forme kystique a été obtenue après culture *in vitro* en utilisant différents milieux d'enkystement, le plus efficace étant une solution saline à base de trypticase (Suresh et al. 1993). Il est également possible d'obtenir des formes kystiques en milieu de Jones, à partir d'une culture de parasites issus de selles (Suresh et al. 2009) et de les isoler par centrifugation (Zaman et Khan 1994).

La culture du parasite en boîte de Pétri sur un milieu IMDM agar semi-solide a permis l'obtention des formes amiboïdes. Ce milieu a également permis l'obtention de souches clonales (Tan et al. 1996a, 2000 ; Ng et Tan 1999 ; Valido et Rivera 2007) (**Figure 9**). L'addition dans le milieu d'un agent réducteur comme le thioglycollate de sodium favorise également l'efficacité de croissance des colonies (Tan et al. 1996b). L'utilisation d'une telle méthode permet de séparer physiquement les colonies de *Blastocystis* sp. des colonies bactériennes. Une seule colonie parasitaire peut ensuite être prélevée et mise en culture en milieu liquide ou solide. Les cultures sont ensuite conservées dans des jarres d'anaérobiose.

### III.3. Les méthodes moléculaires et le sous-typage des isolats

Comme décrit dans le **Par. II.2.**, plusieurs méthodes moléculaires de détection suivies en général du sous-typage du parasite ont été décrites. Les premières ayant été mises au point dans les années 1990 (RAPD, RFLP essentiellement basée sur l'amplification de gène de l'ADNr 18S) sont maintenant très peu utilisées car ne donnant que peu d'informations en termes de séquences. Cependant, ces premières approches de RAPD ont permis de déterminer des amorces spécifiques d'un ST particulier de *Blastocystis* sp. (Yoshikawa et al. 1998, 2004b,c ; Yan et al. 2006). Malheureusement, cette approche (STS-PCR) ne permet actuellement de détecter que 7 des 17 STs décrits jusqu'à présent (ST1 à ST7). En revanche, elle permet de détecter aisément les co-infections par différents STs. Très rapidement se sont

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

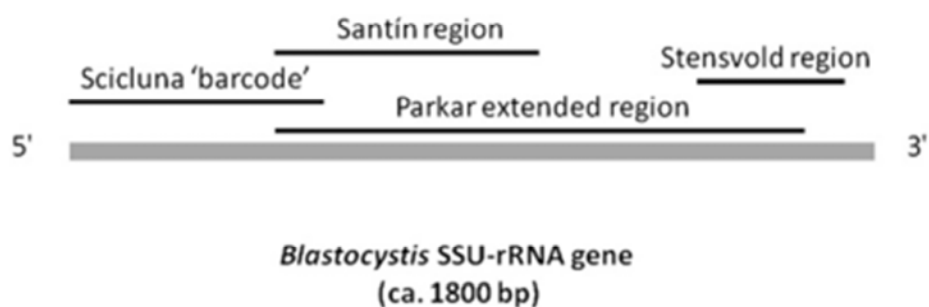
alors développées des méthodes d'identification du parasite dans les selles basées sur l'amplification du gène complet de l'ARNr 18S couplée à un séquençage du produit d'amplification pour le sous-typage des isolats. Dans un premier temps, le gène était séquencé dans sa totalité (Arisue et al. 2003 ; Noël et al. 2003, 2005) mais très vite plusieurs auteurs (Scicluna et al. 2006 ; Stensvold et al. 2006 ; Parkar et al. 2010; Santín et al. 2011) ont montré que différents fragments de ce gène était suffisamment informatif pour détecter et sous-typer les isolats (**Figure 10**). Le fragment de 600 pb proposé par Scicluna et al. (2006) demeure le plus utilisé dans la plupart des études épidémiologiques du fait de sa spécificité, sa facilité de séquençage (extrémité 5' du gène) et l'abondance de séquences de ce domaine dans les bases de données (Clark et al. 2013 ; Stensvold 2013b). Afin de permettre la détection de co-infections par différents STs, cette méthode nécessite de cloner le produit de PCR obtenu puis de séquencer plusieurs clones (Meloni et al. 2012). Cette étape supplémentaire rend difficile et coûteuse la réalisation du sous-typage lorsque le nombre d'isolats analysés est important. Néanmoins, c'est la méthode de référence pour mener des études épidémiologiques car tous les STs peuvent être détectés et une forte diversité génétique a été identifiée au sein de certains STs (Stensvold et al. 2012b). Récemment, deux méthodes de PCR en temps réel ont été développées ciblant respectivement une région de 152 bases d'un gène inconnu (Jones et al. 2008) et une région de l'ARNr 18S de 320 à 350 pb selon les STs (Poirier et al. 2011). Cette dernière approche développée par Poirier et al. (2011) est très sensible et maintenant fréquemment utilisée dans les études épidémiologiques. En effet, du fait de la technologie utilisée (SYBR green), elle permet le sous-typage des isolats par séquençage du produit d'amplification ce qui n'est pas le cas de la PCR en temps réel proposée par Stensvold et al. (2012a). Cette dernière méthode utilise la technologie TaqMan incluant une sonde contrôle interne qui permet la détection spécifique du parasite mais empêche tout séquençage direct du produit d'amplification. De ce fait, elle nécessite donc de revenir dans un second temps à une PCR standard suivi d'un séquençage si l'on souhaite sous-typer les isolats. Actuellement, des PCR en temps réel multiplex permettant la détection simultanée de plusieurs protozoaires intestinaux dont *Blastocystis* sp. dans les selles de patients sont en cours de développement et semblent prometteuses (Stark et al. 2013 ; Maas et al. 2014). Cependant, là encore, le sous-typage nécessite de compléter cette approche par une PCR standard suivie d'un séquençage. Enfin, une méthode alternative de détection a été proposée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) mais ne permet pour l'instant que la détection de 5 STs (Martiny et al. 2014).





**Figure 9 :** Colonies de *Blastocystis* sp. observées après 7 jours d'incubation sur milieu solide (Tan et al. 2000).

Les colonies ont un diamètre de 1 à 2 mm et ont une forme de dôme.

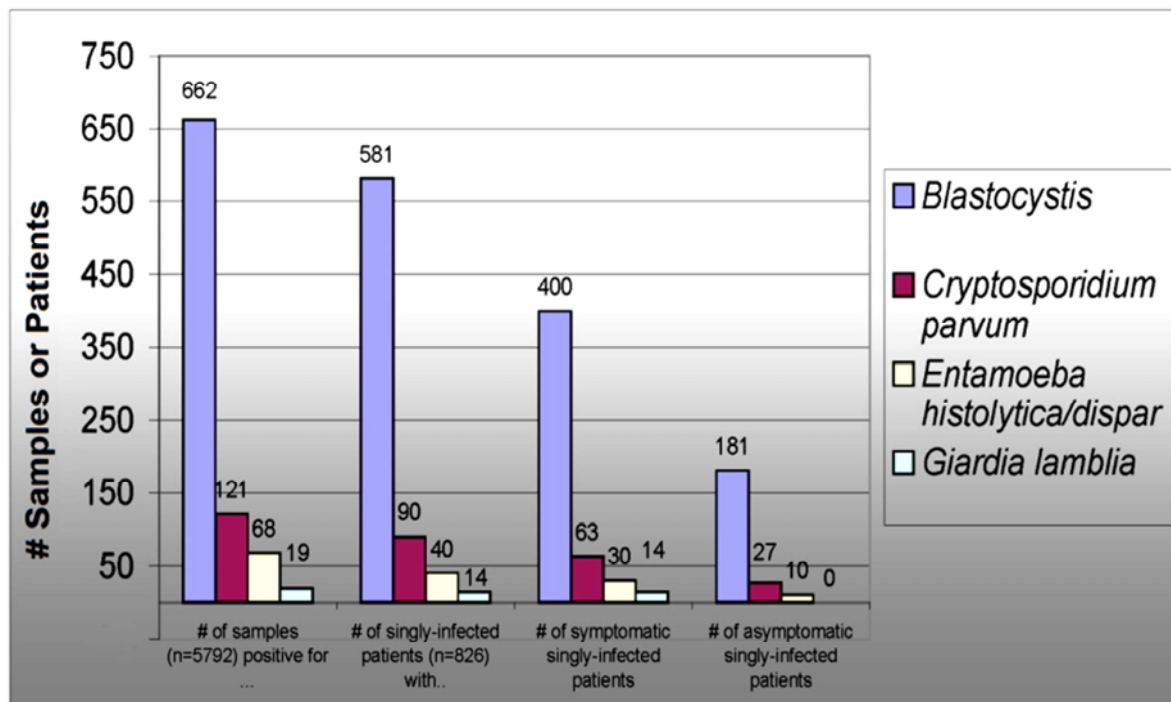


**Figure 10 :** Représentation schématique du gène codant l'ARNr 18S nucléaire de *Blastocystis* sp. Les régions de ce gène utilisées par différents auteurs pour l'identification et le sous-typage des isolats de *Blastocystis* sp. sont représentées (Scicluna et al. 2006 ; Stensvold et al. 2006 ; Parkar et al. 2010 ; Santin et al. 2011).

### IV. Une forte prévalence de *Blastocystis* sp. dans la population humaine

Les auteurs des premières études portant sur *Blastocystis* sp. se désolaient du manque de données de prévalence concernant ce parasite (Boreham et Stenzel 1993, Stenzel et Boreham 1996). Mais très vite, ils ont été écoutés et bon nombre d'études épidémiologiques ont ainsi été publiées au cours des dix dernières années montrant que *Blastocystis* sp. est omniprésent dans toutes les régions du globe. Dans une énorme majorité de pays, il est aujourd'hui le protiste parasite le plus fréquemment retrouvé dans les selles humaines loin devant d'autres protistes parasites à transmission hydrique comme *Giardia*, *Entamoeba* et *Cryptosporidium* (Boorom et al. 2008 ; Clark et al. 2013) (**Figure 11**). De plus, la prévalence de *Blastocystis* sp. est généralement plus importante dans les pays en voie de développement que dans les pays développés. Cela peut facilement s'expliquer par des conditions d'hygiène plus précaires dans les pays en développement et à un moindre niveau à un contact plus étroit de la population avec des réservoirs animaux de transmission (Tan 2008 ; Clark et al. 2013). Dans la plupart de ces études, la recherche du parasite a été réalisée par des méthodes non moléculaires en l'occurrence l'observation microscopique des selles fraîches ou la mise en culture préalable d'un échantillon de selles suivie d'une observation. Comme indiqué dans le **Par. III**, ces méthodes d'identification sont moins sensibles que les méthodes moléculaires. De ce fait, il est plus que probable que la plupart des prévalences relatées ci-dessous soient sous-estimées alors qu'elles sont déjà importantes dans bon nombre de pays. Pour des raisons de clarté pour le lecteur, les données sont rapportées par continent et les quelques prévalences obtenues par des méthodes moléculaires sont soulignées ainsi que les auteurs de ces études.

En Asie, la prévalence de *Blastocystis* sp. n'est que de 0,5 à 1% au Japon (Horiki et al. 1997 ; Hirata et al. 2007) et de 3,3% à Singapour (Wong et al. 2008), deux pays très urbanisés. Par contre, dans des régions d'Asie plus rurales, cette prévalence peut atteindre 60% comme chez des enfants en Indonésie (Pegelow et al. 1997) et 25% dans une communauté des Philippines (Santos et Rivera 2013). En Thaïlande, les données sont assez contradictoires puisque la prévalence est de 13,5% dans une population d'enfants du district de Phuttamonthon (Yaicharoen et al. 2006) et de 6,2% chez des écoliers du même district mais fréquentant des écoles différentes (Ngrenngarmlet et al. 2007). Cette prévalence est du même ordre de grandeur (14,5%) dans une cohorte de soldats thaïlandais (Leelayoova et al. 2009) mais chute curieusement à 1,5% dans des régions rurales du pays (Laodim et al. 2012 ; Boonjaraspinyo et al. 2013) ou à 5,9% aux alentours de Bangkok (Inpankaew et al. 2007). Par contre, elle grimpe à 31,9% par des méthodes moléculaires dans un internat de jeunes femmes



**Figure 11** : Prévalence des protistes parasites intestinaux aux USA (Boorom et al. 2008).

On note que la prévalence de *Blastocystis* sp. est nettement supérieure à celle observée pour d'autres protistes parasites intestinaux tels que *Cryptosporidium*, *Entamoeba* et *Giardia*.

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

de la même ville ([Thathaisong et al. 2013](#)). Ces différences de valeurs sont encore plus significatives en Malaisie. En effet, la prévalence de *Blastocystis* sp. est de 52,3% (Noor Azian et al. 2007), de 3,9% (Sinniah et al. 2012) ou varie de 13,3 à 24,7% (Anuar et al. 2013) dans différentes populations arborigènes malaisiennes. Au Pakistan, cette prévalence est de 10,2% dans une cohorte d'enfants de Karachi (Mehraj et al. 2008) et de 17,4% dans la population totale (Haider et al. 2012). Au Népal, la prévalence déterminée par PCR est de 26,1% dans la population totale ([Lee et al. 2012a](#)) et de 24,4% dans une cohorte d'enfants ([Yoshikawa et al. 2009](#)). En Turquie, plusieurs études ont été menées dans différentes régions, dans différents hôpitaux, sur des populations totales ou des cohortes d'écoliers. Sans rentrer dans les détails, les valeurs de prévalence sont comprises entre 6,5 et 32,8% (Arslan et al. 2008 ; Dagci et al. 2008 ; Yaman et al. 2008 ; [Dogruman-Al et al. 2008, 2009](#) ; Hamamci et al. 2011 ; Düzyol et al. 2012 ; Turgay et al. 2012 ; Yilmaz et al. 2012 ; Gülmez et al. 2013). Au Moyen-Orient, cette prévalence est de 2,2% (Haghighi et al. 2009) dans la région de Zahedan en Iran mais de 13,5% chez des enfants dans le Nord du Pays (Daryani et al. 2012). Elle atteint même 23,8% dans un hôpital de Téhéran (Moosavi et al. 2012). Au Qatar, la seule étude réalisée mentionne une prévalence de 4,3% (Abu-Madi et al. 2010). Les différences de prévalence sont aussi très significatives (de 2 à 34,2%) chez les enfants de différentes communautés (Bédouin, Juifs et Ethiopiens) vivant dans le sud d'Israël (Ben-Shimol et al. 2014). Pour ce qui est de la Chine et malgré la population importante de ce pays, très peu d'études ont été réalisées. On peut cependant citer celles de Wang et al. (2002) indiquant une prévalence comprise entre 1 et 6% selon les cohortes d'individus étudiés dans la province d'Anhui, de [Li et al. \(2007a\)](#) avec une prévalence déterminée par PCR de 32,6% dans un village de la province du Yunnan et de [Li et al. \(2007b\)](#), toujours par PCR, et une prévalence comprise entre 1,9 et 32,6% selon les 4 régions chinoises étudiées.

En Afrique et tout d'abord en Afrique du Nord, la prévalence du parasite est de 33,3% en Egypte (Rayan et al. 2007), d'environ 29% au Maroc (Tligui et al. 2002 ; El Guamri et al. 2011), de 11,2% en Algérie (Benouis et al. 2013) et de seulement 7,3% en Tunisie (Trabelsi et al. 2010). En Lybie, cette prévalence est de 22,1% (Abdulsalam et al. 2013a,b) ou de 26,6% (Alfellani et al. 2007) selon les régions par des méthodes non moléculaires. Par PCR, cette prévalence est assez similaire puisque de l'ordre de 28% dans ce même pays ([Alfellani et al. 2013c](#)). En Afrique de l'Est, seule une étude est référencée en Tanzanie avec une prévalence chez des enfants atteignant 28% (Speich et al. 2013). En Afrique de l'Ouest, la prévalence du parasite est de 20,4% en Côte d'Ivoire (Becker et al. 2011) mais elle grimpe à 70% au Libéria et à 49% au Nigeria par des approches moléculaires ([Alfellani et al. 2013c](#)).

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

En Amérique du Nord, très peu d'études ont été publiées et indiquent une prévalence d'environ 20% aux USA (Amin 2002, 2006) et de 0 à 7,4% chez des enfants dans différentes localités du Mexique (Zumaquero-Rios et al. 2013). Par contre, les données sont plus nombreuses en Amérique du Sud avec des prévalences de 36,4% dans la population totale (Londono et al. 2009) et de 57,5 % chez des enfants (Londono-Franco et al. 2014) par microscopie et de 45% dans la population totale par PCR (Ramirez et al. 2013) en Colombie. Elles sont de 23% ou 27,2 % dans des populations vivant dans des régions rurales (Minvielle et al. 2004 ; Basualdo et al. 2007) ou de 43% dans une cohorte d'enfants de Buenos Aires (Orden et al. 2014) en Argentine, de 47% chez les enfants de la Communauté indigène de Merida au Venezuela (Velasco et al. 2011) et de 38,5% chez des enfants à Cuba (Canete et al. 2012). Elle atteint 53,3% chez des enfants (Espinoza el. 2008) et 40% dans une communauté de la forêt amazonienne (Machicado et al. 2012) au Pérou. Au Brésil, la prévalence est variable selon les cohortes d'individus étudiées : 38% chez des écoliers du district de Sao Paulo (Amato Neto et al. 2004), seulement 4,6% dans ce même district dans la population totale (Miné et Rosa 2008), 26,5% dans la population totale du district de Pitanga (Nascimento et Moitinho Mda 2005), 57,8% dans la communauté indigène de Mapuera (Borges et al. 2009), 21% par PCR dans la communauté indigène de Tapirapé (Malheiros et al. 2011), 40,9% dans celle de l'état de Mato Grosso do Sul (Aguiar et al. 2007) et enfin 22,4% dans la région urbaine de Belo Horizonte (Gil et al. 2013).

En Océanie, les seules données concernent l'Australie avec une même prévalence de l'ordre de 19% par des méthodes non moléculaires (Roberts et al. 2011) ou moléculaires pour deux études réalisées dans la région de Sydney (Roberts et al. 2013a).

Enfin en Europe, très peu de données sont finalement disponibles malgré l'impact potentiel du parasite. En France, la prévalence serait de l'ordre de 6% dans la population totale (Bourée 2007). Elle serait de 51,5% dans la région de Catalogne en Espagne (Gonzalez-Moreno et al. 2011) et approcherait ou dépasserait les 10% en Italie (Masucci et al. 2011 ; Calderaro et al. 2014). Aux Pays-Bas, la prévalence globale est de l'ordre de 24,2% dans la population totale à Amsterdam (Bart et al. 2013) et de 43% dans une cohorte d'enfants d'une autre région du pays (Maas et al. 2013). Au Danemark, elle serait comprise entre 11,5% (Betangbeh et al. 2009) à 19% (Stensvold et al. 2009b).

Dans plusieurs pays comme par exemple le Brésil, la Turquie ou la Chine, on observe ci-dessus des valeurs de prévalence extrêmement variables alors que des techniques similaires généralement non moléculaires ont été utilisées par les différents observateurs. Ces différences peuvent s'expliquer par la difficulté d'identifier certaines formes du parasite au

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

microscope et par l'absence d'entraînement de certains observateurs. De ce fait, le développement à moindre coût de méthodes moléculaires rapides et sensibles devrait sans nul doute gommer ces différences importantes observées entre et au sein des pays. Clark et al. (2013) ont suggéré de réaliser deux ou plusieurs enquêtes dans le même pays pour avoir une idée réaliste de la prévalence du parasite mais ce n'est pourtant pas le cas dans les 3 pays cités en exemple ci-dessus. Ces différences peuvent donc aussi refléter de réelles différences épidémiologiques. Un autre biais dans ces données est que la population analysée est souvent déjà fortement orientée. En effet, les cohortes de patients étudiés sont très variables et peuvent représenter un échantillon de la population totale incluant des adultes et des enfants ou seulement des écoliers, des populations urbaine ou rurale avec des conditions d'hygiène différentes ou bien encore des patients présentant ou non des symptômes digestifs ou des pathologies diverses. Il est alors rare que les enquêtes soient assez larges ou que la population examinée soit suffisamment diversifiée pour être représentative de la prévalence globale du parasite dans le pays.

Concernant les populations d'enfants, une analyse des données présentées ci-dessus ne montre pas, comme cela a déjà été décrit pour d'autres parasites, de prévalences significativement plus importantes dans ces groupes de jeunes individus si on les compare à celles observées dans les populations d'adultes. Bien au contraire puisque plusieurs auteurs ont suggéré que l'augmentation de l'âge serait plutôt un facteur de risque d'infection à *Blastocystis* sp. (Hirata et al. 2007 ; Abu-Madi et al. 2010 ; Gonzalez-Moreno et al. 2011 ; Forsell et al. 2012 ; Abdulsalam et al. 2013a ; Benouis et al. 2013 ; Boonjaraspinyo et al. 2013 ; Calderaro et al. 2014 ; Engsbro et al. 2014). Il est aussi important d'analyser la nature de la population étudiée dans le cadre des enquêtes réalisées et en particulier si certains individus inclus dans la cohorte sont des voyageurs ou des migrants. Par exemple, en Italie, la prévalence dans la population totale serait d'environ 10% (Masucci et al. 2011 ; Calderaro et al. 2014) alors qu'elle atteint 52,7% dans ce pays chez des migrants venant essentiellement d'Afrique et d'Asie (Gualdieri et al. 2011). Ce sont d'ailleurs les deux continents les plus risqués en termes de facteur de risque d'infection à *Blastocystis* sp. d'après une étude réalisée en Allemagne et dans laquelle près de 40% des voyageurs étaient contaminés à leur retour de ces régions du globe (Herbinger et al. 2011). Toujours en Allemagne, la différence de prévalence du parasite est très significative entre voyageurs et sédentaires (Paschke et al. 2011). Un autre exemple concret concerne les Pays-Bas puisque les patients du département de médecine tropicale ayant récemment voyagé sont presque 3 fois plus infectés par *Blastocystis* sp. que ceux des autres départements de l'hôpital (Bart et al. 2013). Enfin, un

autre facteur pouvant faire varier les données obtenues est tout simplement la saison ou la période à laquelle ont été réalisées les études. En effet, pour ce type de parasite à transmission hydrique, la prévalence en été ou durant la saison des pluies serait significativement plus importante que durant les autres périodes de l'année d'après plusieurs études épidémiologiques (Suresh et al. 2005 ; Amin 2006 ; Trabelsi et al. 2010 ; Haider et al. 2012 ; Laodim et al. 2012).

### V. La distribution des sous-types de *Blastocystis* sp. dans la population humaine

Comme indiqué dans le **Par. II.2.**, 17 STs de *Blastocystis* sp. ont à ce jour été identifiés. Pour l'instant, 9 de ces 17 STs ont été retrouvés chez l'homme avec des fréquences très variables. Dans un article récent, Alfellani et al. (2013c) ont synthétisé toutes les données de sous-typage disponibles dans la littérature à la date de soumission de leur revue et ce pour un nombre important de pays (**Figure 12**). Ainsi, un total de 3171 isolats de *Blastocystis* sp. ont été sous-typés depuis 1997 et les travaux de Clark. Brièvement on note que les STs 1, 2, 3 et 4 représentent plus de 90% de ces isolats. Même si, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, ces 4 STs peuvent aussi être retrouvés chez les animaux, leur prédominance dans la population humaine peut très probablement s'expliquer par une très large transmission inter-humaine qu'elle soit directe par contact avec des patients infectés ou indirecte par ingestion d'eau ou de nourriture contaminées par des matières fécales humaines contenant le parasite. Les autres STs (ST5 à ST9) ne représentant qu'environ 7% des isolats et sont très probablement le résultat d'une transmission zoonotique car ces STs sont généralement retrouvés chez les animaux (**voir Par. VI**).

Dans le tableau présenté **Figure 12**, une fraction minime des isolats n'a pu être sous-typée (ST inconnu) du fait essentiellement de la technique utilisée dans certaines études (par exemple la STS-PCR n'amplifiant que les ST1 à ST7). On note aussi dans ce tableau la valeur de 6% pour les infections mixtes c'est-à-dire des infections par au moins deux STs différents de *Blastocystis* sp. Dans quelques cas, les STs impliqués dans ces infections mixtes ont pu cependant être déterminés par STS-PCR ou PCR standard suivi du clonage du produit de PCR et du séquençage de plusieurs clones (Souppart et al. 2009) et additionnés aux données des mono-infections.

Parmi ces 4 STs, le ST3 est prédominant dans une majorité de pays (1399/3171 isolats sous-typés soit 44,1%) suivi du ST1 (27,8%), du ST2 (10,8%) et du ST4 (10%). Globalement le ST3 est prédominant à travers le monde mais on note que le ST4 est prédominant dans des



## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

études menées dans quelques pays européens comme le Danemark (Stensvold et al. 2011), la France (Poirier et al. 2011) et l'Espagne (Dominguez-Marquez et al. 2009). Pour ce qui est du ST1, il est prédominant dans des études menées en Asie comme en Iran (Motazedian et al. 2008), au Pakistan (Yakoob et al. 2010a), en Turquie (Eroglu et al. 2009), aux Philippines (Rivera et Tan 2005) et en Thaïlande (Thathaisong et al. 2013) ou en Amérique du Sud comme au Brésil (Malheiros et al. 2011). Enfin le ST7 qui est généralement assez rare dans la population humaine est pourtant prédominant dans une étude menée au Népal (Lee et al. 2012a). Il faut cependant être prudent dans l'interprétation de ces données car des différences significatives en termes de distribution des STs ont été mises en évidence au sein même de plusieurs pays. En France par exemple, Souppart et al. (2009) ont identifié le ST3 comme ST prédominant chez des patients infectés dans le Nord de la France alors que pour Poirier et al. (2011), le ST4 était prédominant dans une population de patients du centre de la France. La fréquence des ST1 et ST3 est aussi très différente dans deux régions voisines de Chine (**Figure 13**) (Yan et al. 2006 ; Li et al. 2007a,b). Ces différences peuvent refléter des sources de contamination différentes ou des variations dans la nature des populations étudiées.

Toutes ces données pourraient laisser sous-entendre des variations de fréquences des STs en fonction des zones géographiques. En effet, si on analyse la distribution des STs par continent (**Figure 14**), on observe que le ST4 est très fréquent en Europe et quasiment absent ou faiblement représenté dans les autres continents. Par contre, les ST6 et ST7 sont plus fréquents en Afrique et en Asie qu'en Europe. Ces différences sont très probablement liées à une forte variabilité dans les sources et modes d'infection et ce point sera discuté dans les paragraphes suivants de la thèse (**Par. VII.**). Quoiqu'il en soit, ces données illustrent bien la complexité de l'épidémiologie de *Blastocystis* sp. et probablement la très grande variété des réservoirs environnementaux de transmission du parasite.

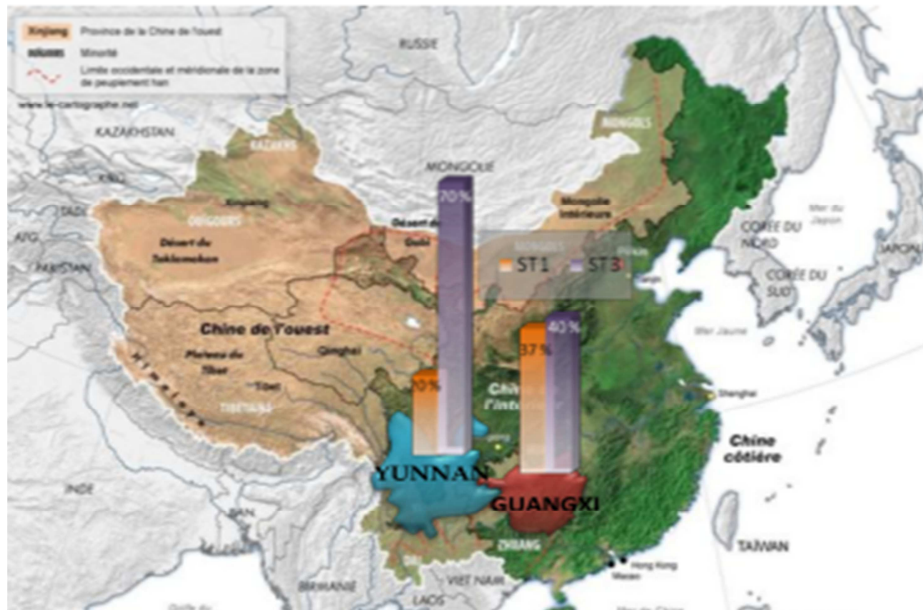
Depuis cette revue de référence d'Alfellani et al. (2013c), plusieurs autres études ont été publiées afin de compléter ces données. La plupart de ces études vont dans le sens des conclusions énoncées ci-dessus. En Suède, le ST3 est aussi prédominant suivi du ST4 qui est en proportion importante comme dans les autres pays européens (Forsell et al. 2012). C'est aussi le cas au Danemark (Bart et al. 2013). Par contre en Russie, des données surprenantes ont été observées dans une cohorte de patients de Saint-Petersbourg puisque les auteurs montrent une prédominance des ST5 et ST6 qui sont généralement rares chez l'homme (Sigidaev et al. 2013). En Colombie, le ST1 est comme au Brésil prédominant suivi des ST2 et ST3 (Ramirez et al. 2013). En Lybie, le ST1 est prédominant suivi des ST2 et ST3 (Abdulsalam et al. 2013b). En Thaïlande, la prédominance du ST1 observée dans plusieurs



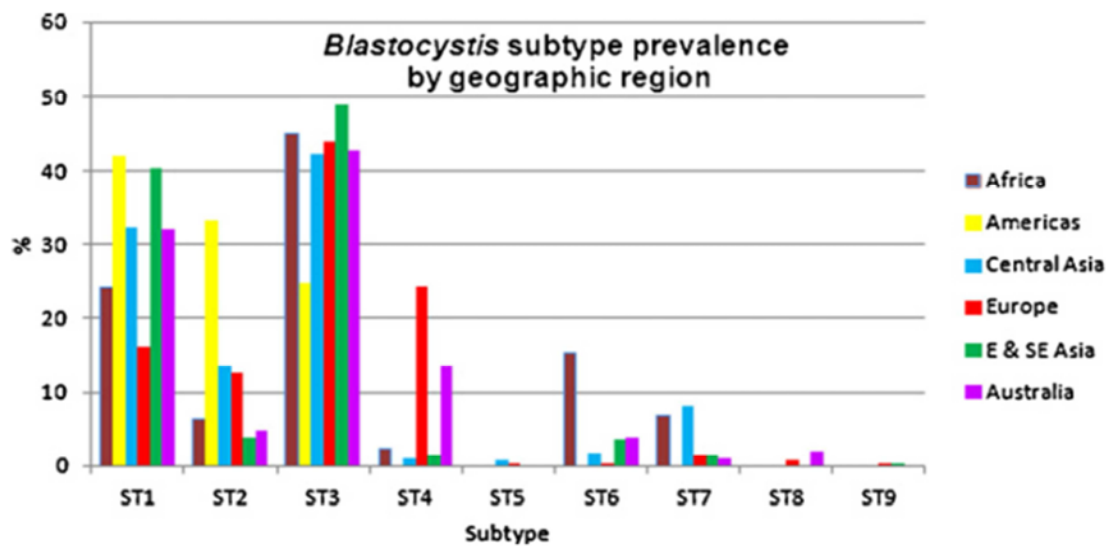
Country of sample origin	Technique#	No. of subtype observations	Subtype distribution											
			ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	Mixed ST	Unknown ST	
Brazil	Sequencing	73	33	27	13	-	-	-	-	-	-	7	-	
Colombia	Sequencing	13	5	4	4	-	-	-	-	-	-	1	-	
USA	Sequencing	7	1	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	
Americas total		93	39	31	23	0	0	0	0	0	0	8	0	
Denmark	Sequencing	29	1	6	15	7	-	-	-	-	-	-	-	
Denmark	Sequencing	28	5	9	13	1	-	-	-	-	-	-	-	
Denmark	Sequencing	92	20	15	39	16	-	1	-	1	-	7	-	
Denmark	Sequencing	143	31	39	42	24	-	-	6	-	1	26	-	
Denmark	Sequencing	25	1	4	1	19	-	-	-	-	-	-	-	
Denmark	Sequencing	24	11	-	13	-	-	-	-	-	-	2	-	
France	Sequencing	43	11	4	23	4	-	-	1	-	-	3	-	
France	Sequencing	27	1	1	4	17	-	1	3	-	-	-	-	
Germany	RFLP	171	40	1	118	12	-	-	-	-	-	8	-	
Germany	STS	12	3	2	5	2	-	-	-	-	-	-	-	
Greece	SSCP	45	9	6	27	1	-	1	1	-	-	-	-	
Ireland	Sequencing	14	1	6	4	3	-	-	-	-	-	-	-	
Italy	Sequencing	34	3	7	16	6	-	-	1	1	-	4	-	
Spain	RFLP	51	1	2	-	48	-	-	-	-	-	-	-	
Sweden	Sequencing	63	10	9	30	13	-	-	1	-	-	-	-	
UK	RFLP	29	2	1	22	4	-	-	-	-	-	-	-	
UK	Sequencing	48	2	8	20	16	-	-	1	1	-	1	-	
UK	Sequencing	271	34	26	114	85	2	1	4	5	-	-	-	
Europe total		1149	186	146	506	278	2	4	18	8	1	51	0	
Egypt	STS	110	15	-	49	-	-	33	13	-	-	10	-	
Egypt	STS	44	8	-	24	-	-	8	4	-	-	-	-	
Egypt	Sequencing	21	4	4	13	-	-	-	-	-	-	1	-	
Liberia	Sequencing	25	7	7	8	3	-	-	-	-	-	5	-	
Libya	Sequencing	38	19	3	15	-	-	-	1	-	-	-	-	
Nigeria	Sequencing	22	10	-	9	3	-	-	-	-	-	1	-	
Tanzania	Sequencing	6	1	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
Africa total		266	64	17	120	6	0	41	18	0	0	17	0	
Bangladesh	STS	26	2	-	24	-	-	-	-	-	-	-	-	
Iran	RFLP	40	20	4	16	-	-	-	-	-	-	-	5	
Iran	STS	141	48	33	53	-	-	-	7	-	-	33	-	
Nepal	STS	20	4	4	12	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nepal	STS	101	40	-	-	-	-	8	53	-	-	41	8	
Pakistan	STS	10	2	-	7	-	-	1	-	-	-	-	-	
Pakistan	STS	177	87	10	49	8	7	6	10	-	-	-	2	
Turkey	Sequencing	87	8	12	66	1	-	-	-	-	-	-	-	
Turkey	STS	96	19	22	55	-	-	-	-	-	-	4	-	
Turkey	STS	32	20	3	9	-	-	-	-	-	-	-	-	
Turkey	STS	38	3	13	22	-	-	-	-	-	-	3	-	
Turkey	STS	75	19	11	45	-	-	-	-	-	-	9	-	
Turkey	STS	25	9	6	10	-	-	-	-	-	-	-	-	
Central asia total		868	281	118	368	9	7	15	70	0	0	90	15	
China	STS	38	17	-	19	-	-	-	2	-	-	5	1	
China	STS	194	56	11	125	1	-	1	-	-	-	10	8	
China	STS	76	18	1	56	1	-	-	-	-	-	2	3	
Japan	STS	32	1	-	30	-	-	1	-	-	-	-	-	
Japan	RFLP	61	11	13	30	7	-	-	-	-	-	-	3	
Japan	STS	50	4	-	26	2	-	11	5	-	2	-	-	
Malaysia	STS	20	9	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	
Malaysia	STS	38	5	-	20	-	-	11	2	-	-	-	2	
Philippines	RFLP	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
Singapore	RFLP	9	2	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	
Thailand	RFLP	159	144	-	13	-	-	-	2	-	-	6	-	
Thailand	STS	5	2	-	2	-	-	1	-	-	-	1	-	
E & SE-Asia Total		692	279	26	338	11	0	25	11	0	2	24	19	
Australia	Sequencing	12	5	-	4	2	-	1	-	-	-	1	-	
Australia	Sequencing	91	28	5	40	12	-	3	1	2	-	-	-	
Australia total		103	33	5	44	14	0	4	1	2	0	1	0	
EARTH	Total	3171	882	343	1399	318	9	89	118	10	3	191	34	

# STS: Sequence-tagged site; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SSCP, single strand conformation polymorphism.

**Figure 12 :** Distribution des STs dans la population humaine par continent et par pays (Alfellani et al. 2013c). Les méthodes moléculaires ayant permis de sous-typer les isolats sont indiquées ainsi que le nombre d'infections mixtes (mixed ST). Un certain nombre d'isolats n'ont pas pu être sous-typés du fait de la méthode moléculaire (RFLP, STS-PCR) utilisée dans certaines études.



**Figure 13 :** Différences de répartition des ST1 et ST3 en Chine dans deux provinces voisines (Yan et al. 2006 ; Li et al. 2007a,b).



**Figure 14 :** Synthèse de la répartition des STs dans la population humaine par continents (Alfellani et al. 2013c).

pays asiatiques est confirmée dans une première étude réalisée dans un internat (Thathaisong et al. 2013). Par contre, une seconde étude menée dans ce même pays indique une prédominance du ST3 suivi en proportion importante du ST1 (Jantermtor et al. 2013). Dans cette dernière étude, plus de 20% des isolats appartiennent aux ST6 et ST7 confirmant la forte prévalence de ces STs dans les pays asiatiques.

### **VI. La distribution des sous-types de *Blastocystis* sp. chez les animaux et l'évaluation du potentiel zoonotique du parasite**

Un nombre important d'études menées dans différents pays ont visé à rechercher *Blastocystis* sp. chez de nombreux groupes d'animaux qu'ils soient sauvages ou en captivité (zoo, cirque, animaux de compagnie, élevages...). Ainsi *Blastocystis* sp. a été identifié par analyse microscopique directe des selles, par culture des selles suivie d'une observation microscopique ou par des méthodes moléculaires chez les primates non humains (Yamada et al. 1987 ; Cassidy et al. 1994 ; König et Müller 1997 ; Init et al. 1999 ; Abe et al. 2002, 2003a ; Yoshikawa et al. 2003b, 2004c, 2009 ; Jones-Engel et al. 2004 ; Parkar et al. 2007, 2010 ; Lim et al. 2008 ; Rivera 2008 ; Stensvold et al. 2009a ; Petrasova et al. 2011 ; Santin et al. 2011 ; Drakulovski et al. 2014 ; Alfellani et al. 2013b ; Ramirez et al. 2013 ; Roberts et al. 2013b ; Sa et al. 2013 ; Maesano et al. 2014), les Artiodactyles (Bovidae, Camelidae, Suidae, Cervidae, Giraffidae, Caprinae) (Stenzel et al. 1993 ; Cassidy et al. 1994 ; Quilez et al. 1995 ; König et Müller 1997 ; Snowden et al. 2000 ; Abe et al. 2002, 2003b ; Arisue et al. 2003 ; Noël et al. 2003 ; Yoshikawa et al. 2003b, 2004c ; Rivera et Tan 2005 ; Yan et al. 2007 ; Navarro et al. 2008 ; Rivera 2008 ; Stensvold et al. 2009a ; Parkar et al. 2010 ; Santin et al. 2011 ; Fayer et al. 2012, 2014 ; Lee et al. 2012b ; Roberts et al. 2013b ; Tan et al. 2013 ; Alfellani et al. 2013a ; Ramirez et al. 2014 ; Wang et al. 2014), les Elephantidae (Parkar et al. 2010 ; Roberts et al. 2013b), les Perissodactyles (Rhinocéros) (Parkar et al. 2007 ; Alfellani et al. 2013a), les Carnivores (Felidae, Canidae, Mustelidae) (Stenzel et al. 1993 ; Duda et al. 1998 ; Lopez et al. 2006 ; Parkar et al. 2007 ; Daryani et al. 2008 ; Chapman et al. 2009 ; Leelayoova et al. 2009 ; Stensvold et al. 2009a ; Eroglu et Koltas 2010 ; Nagel et al. 2012 ; Wang et al. 2013 ; Ramirez et al. 2013), les Lagomorpha (Leporidae) (König et Müller 1997), les Marsupiaux (Parkar et al. 2007, 2010 ; Roberts et al. 2013b ; Ramirez et al. 2013), les oiseaux (Yamada et al. 1987 ; Stenzel et al. 1994 ; Cassidy et al. 1994 ; Yoshikawa et al. 1996, 2003b, 2004c ; König et Müller 1997 ; Snowden et al. 2000 ; Abe et al. 2003c ; Arisue et al. 2003 ; Noël et al. 2003 ; Rivera et Tan 2005 ; Rivera 2008 ; Santin et al. 2011 ; Alfellani

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

et al. 2013a ; Marques et al. 2013 ; Ramirez et al. 2013 ; Roberts et al. 2013b), les reptiles (Teow et al. 1991, 1992 ; Singh et al. 1996 ; Yoshikawa et al. 1996 ; König et Müller 1997 ; Suresh et al. 1997 ; Ho et al. 2001), les rongeurs (Chen et al. 1997 ; König et Müller 1997 ; Snowden et al. 2000 ; Ho et al. 2001 ; Noël et al. 2003 ; Yoshikawa et al. 2003b ; Alfellani et al. 2013a ; Ramirez et al. 2013), les poissons (König et Müller 1997), les amphibiens (grenouilles et crapaud pour l'instant) (Yoshikawa et al. 2004d), les mollusques (Perez-Cordon et al. 2007) et les insectes (blattes) (Zaman et al. 1993 ; Suresh et al. 1997 ; Yoshikawa et al. 2007).

La prévalence du parasite chez ces groupes d'animaux est extrêmement variable selon les enquêtes réalisées mais peut atteindre des valeurs spectaculaires. Par exemple, au Japon, elle est de 57,7% (Yamada et al. 1987) ou de 85% (Abe et al. 2002) dans des groupes de singes, de 100% dans une population d'oiseaux (Yamada et al. 1987), de 71% chez des bovins, de 95% chez des cochons (Abe et al. 2002) et de 84,6% à 100% selon les espèces d'amphibiens (grenouilles ou crapaud) (Yoshikawa et al. 2004d). Toujours en Asie, 28,6% des reptiles étaient infectés dans une étude menée à Singapour (Teow et al. 1992), 30,9% des chèvres en Malaisie (Tan et al. 2013), 36,4% des cochons au Népal (Lee et al. 2012b) et 45,2% des cochons au Cambodge (Wang et al. 2014). En Europe, on note quelques valeurs très importantes : 88% des singes et 60% des cochons testés en Allemagne étaient infectés (König et Müller 1997) ainsi que 46,8% des cochons en Espagne (Navarro et al. 2008). En Australie, 76,7% des cochons étaient positifs pour *Blastocystis* sp. dans un élevage (Wang et al. 2014). Toujours en Australie, 70,8% des chiens et 67,3% des chats étaient infectés (Duda et al. 1998). C'est le cas aussi pour 36% des chiens et 37% des chats au Chili (Lopez et al. 2006) et 28% des chiens errants en Iran (Daryani et al. 2008).

Les isolats de *Blastocystis* sp. trouvés chez l'homme comme chez de nombreux hôtes animaux étant très similaires sur un plan morphologique, c'est avec les premières données moléculaires que l'hypothèse d'un potentiel zoonotique du parasite et d'une faible spécificité d'hôte de certains isolats a été avancée. Init et al. (1999) mirent en évidence qu'un des isolats de singes obtenus dans leur étude présentait un profil RAPD similaire à celui d'un isolat humain. Snowden et al. (2000) et Abe et al. (2003b) ont ensuite montré que plusieurs profils RFLP pouvaient être trouvés chez un même hôte ou que plusieurs hôtes pouvaient partager un même profil de restriction. Ces observations ont dans la foulée été confirmées par Ho et al. (2001), Abe et al. (2003c), Yoshikawa et al. (2003b, 2004c), Rivera et Tan (2005), et Yan et al. (2007) en utilisant le même type de méthode d'identification du parasite. Cependant, ce type d'approche ne permettait pas de s'assurer de la réelle similarité génétique d'isolats

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

communs à plusieurs hôtes différents. C'est donc avec le séquençage de marqueurs moléculaires que cette similarité a pu être mise en évidence. Noël et al. (2003) et Arisue et al. (2003) ont ainsi été les premiers à montrer que des séquences du gène de l'ARNr 18S d'isolats humains pouvaient être identiques à celles d'isolats animaux. Cette similarité a ensuite été confirmée dans plusieurs autres études toujours basées sur la comparaison des séquences de ce gène (Abe et al. 2004 ; Noël et al. 2005 ; Scicluna et al. 2006 ; Parkar et al. 2007, 2010 ; Rivera 2008 ; Yoshikawa et al. 2009 ; Santin et al. 2011) confirmant ainsi le potentiel zoonotique du parasite et sa faible spécificité d'hôte (**Figure 8**). De ce fait, l'homme comme plusieurs groupes d'animaux pouvaient être infectés par différents STs d'après la classification de Stensvold et al. (2007a).

Dès 2009, de larges études épidémiologiques ont alors été menées principalement dans des zoos, des parcs naturels ou des élevages afin d'analyser plus clairement la distribution des différents STs selon les groupes d'animaux et identifier éventuellement de nouveaux STs non encore observés chez l'homme. C'est le cas des enquêtes menées par Stensvold et al. (2009a) au Danemark et au Royaume-Uni, par Parkar et al. (2010) principalement en Australie, par Santin et al. (2011) aux USA et en Espagne, par Petrasova et al. (2011) en Tanzanie, par Fayer et al. (2012) aux USA, par Roberts et al. (2013b) en Australie, et par Alfellani et al. (2013a,b) dans plusieurs pays européens, africains et asiatiques. Grâce à toutes ces données qui ont été en partie synthétisées par Alfellani et al. (2013a,b), la distribution globale des différents STs dans plusieurs groupes d'animaux a pu être analysée (**Figures 15 et 16**). Les primates sont clairement les animaux les plus infectés par *Blastocystis* sp. et plus de 80% de ces animaux le sont par les STs 1 à 5. Or les STs 1 à 4 sont ceux qui sont aussi prévalents dans la population humaine. Par contre, le ST5 est comme nous l'avons vu précédemment rarement trouvé dans la population humaine. Ces données suggèrent donc une transmission probablement aisée entre les singes et l'homme qui pourrait d'ailleurs probablement s'expliquer par leur lien de parenté évolutif. Parkar et al. (2007) ont ainsi montré que les gardiens des primates du zoo de Perth en Australie étaient infectés par des isolats similaires à ceux trouvés chez ces animaux. Plus globalement, 63% des gardiens et autres personnels de ce zoo étaient positifs pour *Blastocystis* sp. alors que seuls 9% d'une population contrôle étaient infectés (Parkar et al. 2010). De même, des enfants Népalais étaient infectés par les mêmes isolats de ST2 que ceux des singes vivant à proximité de leurs habitations dans une région où l'eau et les aliments pouvaient être facilement contaminés par les excréments de ces animaux (Yoshikawa et al. 2009). D'autre part, dans l'étude menée par Stensvold et al. (2009a), certains singes d'un zoo danois étaient infectés par des isolats de ST8 extrêmement

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

rare chez l'homme. Or, 25% des gardiens du zoo étaient contaminés par ce même ST. Enfin, Rajah Salim et al. (1999) en analysant la prévalence de *Blastocystis* sp. dans les selles de personnels en contact permanent avec des animaux (gardiens de zoos ou personnel des abattoirs) en Malaisie ont montré que 41% des manipulateurs d'animaux étaient infectés en comparaison des 17% observés dans un groupe contrôle vivant en ville et sans contact avec les animaux.

Si on relève les données obtenues pour les artiodactyles et essentiellement les bovins, les cochons et les caprins (**Figure 16**), on note une prévalence des ST1, ST5 et ST10 avec cependant certaines particularités selon le groupe d'animaux étudié. Ainsi le ST1 est prédominant chez les caprins (Tan et al. 2013) alors que ce sont les ST5, ST10 et ST14 chez les bovins (Fayer et al. 2012) et les ST1 et ST5 chez les cochons (Santin et al. 2011). A partir de ces données, il est donc possible d'estimer le facteur de risque de transmission à l'homme. En effet, si on s'en tient à ces enquêtes épidémiologiques, les bovins ne représenteraient pas un risque majeur de contamination puisque les ST10 et ST14 sont extrêmement rare ou absent jusqu'à présent chez l'homme et que le ST5 est très peu répandu. Pourtant Dagci et al. (2008) considèrent qu'un contact étroit de la population avec son bétail peut représenter un facteur de risque non négligeable de transmission comme c'est le cas par exemple pour un autre parasite intestinal comme *Cryptosporidium* (Goh et al. 2004). Par contre, ce risque existerait à travers un contact avec des cochons puisque le ST1 est fréquent chez l'homme. Effectivement, Wang et al. (2014) ont montré que 83,3% du personnel d'un élevage de cochons était positif pour *Blastocystis* sp. Cependant, ces auteurs ont observé une prédominance du ST5 et non du ST1 chez ce personnel, ce ST5 étant pourtant rare chez l'homme mais fréquent chez les cochons. Concernant les oiseaux, on note une nette prévalence des ST6 et ST7 classiquement décrits comme des STs aviaires (Noël et al. 2005 ; Tan 2008) et qui sont fréquemment retrouvés chez l'homme en particulier en Asie. Enfin, pour ce qui est des animaux de compagnie comme les chiens, ils pourraient aussi représenter une source potentielle d'infection (Eroglu et Koltas 2010 ; Nagel et al. 2012 ; Wang et al. 2013). Toutes ces observations concernant la spécificité d'hôte plus ou moins large des différents STs ont été synthétisées afin de compléter le cycle biologique du parasite et prendre en considération les réservoirs animaux potentiels de contamination pour l'homme (**Figure 17**) (Tan 2008 ; Wawrzyniak et al. 2013).

Il est cependant fort probable que la simulation de ces possibles transmissions d'isolats entre l'animal et l'homme ne soit pas aussi simple puisque plusieurs STs sont susceptibles d'infecter une même espèce animale. Un exemple significatif concerne l'identification de pas moins de 5 STs différents (ST1, ST3, ST5, ST10, ST14 et ST15) dans une population de 47

Table 1. Overview of *Blastocystis* sp. STs detected in major groups of primates

<i>Blastocystis</i> sp.														Mixed/ unknown ST	Total	References <sup>a</sup>
Host family/genus	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST13	ST15 <sup>b</sup>	ST			
Chimpanzee (including Bonobo ( <i>n</i> =4))	24	11	20	—	12	—	—	—	—	—	—	1	3	71	1, 2, 4, 5, 12	
Gorilla	—	10	2	—	4	—	—	—	—	—	—	—	1	17	1, 12	
Orangutan	10	6	5	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	23	1-4, 6-7, 12, 13	
Gibbons	12	8	3	—	2	—	—	7	—	—	—	1	—	33	1-4, 6-7, 12, 13	
<b>Non-human Homioids</b>	<b>46</b>	<b>35</b>	<b>30</b>	—	<b>20</b>	—	—	<b>7</b>	—	—	—	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>144</b>		
Baboons	3	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	7	1, 6, 7
Mandrill/drill	19	—	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	33	1-4, 6, 7, 13
Macaques	17	19	27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	64	1-3, 6, 7-10, 14
Vervet monkey	12	24	11	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	49	49	1, 2, 3, 5, 6
Colobus monkey	14	2	6	—	—	—	—	—	—	—	5	—	—	3	30	1, 5, 11
Mangabeys	1	1	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	7	1, 13
Allen's swamp monkey	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	1
Guenons	3	1	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	14	1-4, 13
Patas monkey	1	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	1	
Langurs/lutungs	6	1	3	—	2	—	—	1	—	—	—	—	—	1	14	1-4
<b>Cercopithecoidea</b>	<b>76</b>	<b>48</b>	<b>73</b>	—	<b>4</b>	—	—	<b>1</b>	—	—	<b>5</b>	—	<b>19</b>	<b>226</b>		
Woolly monkey	5	5	9	1	—	—	—	19	—	—	—	—	—	39	39	1, 12, 14
Howler monkey	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	
Spider monkey	3	2	—	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—	1	6	1
Marmoset	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	1, 12
Tamarins	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
Saki monkey	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
<b>Ceboids</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	—	—	—	<b>24</b>	—	—	—	—	<b>1</b>	<b>55</b>		
<b>Lemurs</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	—	<b>4</b>	—	—	—	<b>3</b>	—	—	—	<b>1</b>	—	<b>16</b>		
NHP primates total	136 (30.8%)	92 (20.9%)	115 (26.1%)	5 (1.1%)	24 (5.4%)	—	—	35 (7.9%)	—	2 (0.4%)	5 (1.1%)	3 (0.7%)	24 (5.4%)	441 (100%)		1, 2, 3, 6, 7, 12, 13
Humans total	882 (27.8%)	343 (10.8%)	1399 (44.1%)	318 (10.0%)	9 (0.3%)	89 (2.8%)	118 (3.7%)	10 (0.3%)	3 (0.1%)	—	—	—	—	225 (NA)	3171 <sup>d</sup> (100%)	Alfellani <i>et al.</i> submitted.

<sup>a</sup> 'Present study' refers to the Supplementary Table – in Online version only and includes data from other studies as well as the sequences generated here. However, in some published studies nucleotide sequences for some samples have not been made publicly available, with only representative sequences being deposited in GenBank. For instance, in the study by Petršková *et al.* (2011), only 12 sequences were submitted to GenBank and were included in the Supplementary Table – in Online version only, while the remaining data are included in this table as reference no. 5 (see below). In some other studies STs primers (Yoshikawa *et al.* 1998) have been used for ST identification rather than sequencing and so are not in the Supplementary Table – in Online version only but are included here. References: 1 = Present study, 2 = Albe *et al.* (2003), 3 = Albe (2004), 4 = Yoshikawa *et al.* (2004), 5 = Petršková *et al.* (2011), 6 = Parker *et al.* (2007), 7 = Parker *et al.* (2010), 8 = Yoshikawa *et al.* (2009), 9 = Yoshikawa *et al.* (1998), 10 = Yoshikawa *et al.* (2003), 11 = Teichrob *et al.* (2009), 12 = Stensvold *et al.* (2009), 13 = Santin *et al.* (2011), 14 = Seclama *et al.* (2006).

<sup>b</sup> Novel ST (GenBank accession no. KC148211; Alfellani *et al.* manuscript in preparation).

<sup>c</sup> Including *Leontopithecus*.

<sup>d</sup> This total does not include mixed/unknown infections.

**Figure 15 :** Synthèse de la distribution des STs dans les principaux groupes de primates (Alfellani et al. 2013b).



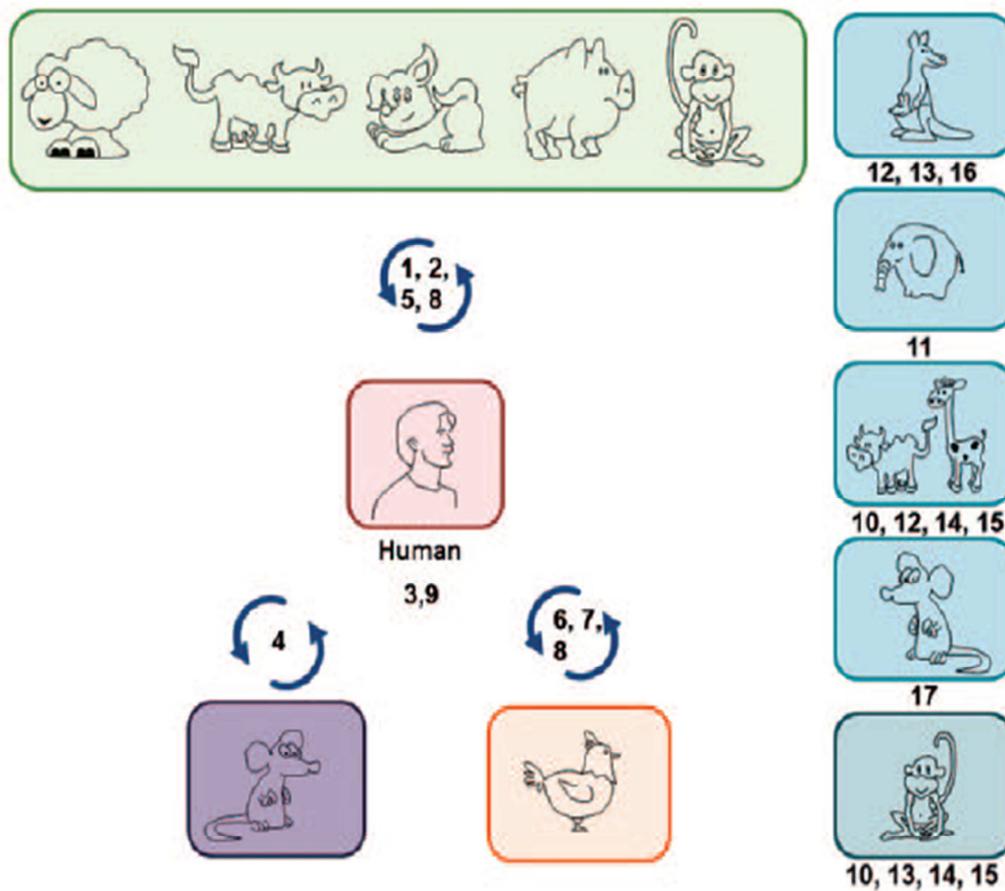
**Table 5.** *Blastocystis* subtypes identified in different animal groups worldwide.

Animal host group	Subtype																	Reference
	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST11	ST12	ST13	ST14	ST15	ST16	ST17	
<b>Placental Mammals</b>																		
<i>Homo sapiens</i> (total)	882	343	1399	318	9	89	118	10	3	-	-	-	-	-	-	-	-	Alfellani et al. (2013)
Non-human primates (total)	105	79	76	4	19	-	-	30	-	2	-	-	1	-	3	-	15	Alfellani et al. (in press)
<b>Artiodactyla</b>																		
-	151	7	10	-	64	-	-	-	-	24	-	-	-	-	-	-	1	Stensvold et al. (2009) <sup>a</sup>
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	Parkar et al. (2010)
-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	Sanlin et al. (2011)
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29	Tan et al. (2013)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	1	-	-	2	Fayer et al. (2012)
-	3	-	2	1	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	Lee et al. (2012)
6	-	7	-	37	-	1	-	-	-	27	-	-	2	6	2	-	-	Roberts et al. (in press)
<b>Total</b>	203	7	19	1	116	3	1	0	0	64	0	4	2	7	2	0	55	<b>Present study</b>
<b>Perissodactyla</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Stensvold et al. (2009)
<b>Total</b>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>Present study</b>
<b>Proboscidea</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Parkar et al. (2010)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	Roberts et al. (in press)
<b>Total</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	Stensvold et al. (2009)
<b>Carnivora</b>	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Eroglu and Kollas (2010)
-	4	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Nagel et al. (2012)
-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Roberts et al. (in press)
<b>Total</b>	6	3	3	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	Stensvold et al. (2009)
<b>Rodentia</b>	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>Present study</b>
<b>Total</b>	0	0	4	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Stensvold et al. (2009)
<b>Marsupials</b>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Stensvold et al. (2009)
<b>Didelphimorphia</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	Parkar et al. (2010)
<b>Diprotodontia</b>	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	Roberts et al. (in press)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	Yoshikawa et al. (unpublished)
<b>Total</b>	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	2	0	0
<b>Birds</b>	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Stensvold et al. (2009)
<b>Anseriformes</b>	3	1	-	-	-	10	11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	Stensvold et al. (2009)
<b>Galliformes</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	Sanlin et al. (2011)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>Present study</b>
-	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Roberts et al. (in press)
-	2	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Roberts et al. (in press)
<b>Ratites</b>	2	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Eroglu and Kollas (2010)
<b>Unidentified</b>	5	4	0	6	0	10	19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5
<b>Total</b>	215	14	26	25	118	13	23	1	0	64	15	6	5	7	2	2	1	60
<b>Mammals and birds total (excluding primates)</b>	215	14	26	25	118	13	23	1	0	64	15	6	5	7	2	2	1	11

<sup>a</sup>The numbers do not match those in this publication because of some double counting identified later, resulting from the same samples being typed by different methods in two publications.

**Figure 16 :** Synthèse de la distribution des STs dans les principaux groupes d'animaux (Alfellani et al. 2013a).





**Figure 17 :** Cycle biologique revisité de *Blastocystis* sp. mettant en avant le potentiel zoonotique du parasite (modifié d'après Tan 2008 et Wawrzyniak et al. 2013).

Ce cycle tient compte de l'existence de STs zoonotiques et montre que l'homme peut être potentiellement infecté par au moins 9 STs. Certains animaux peuvent ainsi représenter d'importants réservoirs de contamination. Les ST3 et ST9 sont principalement ou exclusivement trouvés chez l'homme alors que les ST1, ST2, ST5 et ST8 se trouvent à la fois chez l'homme et chez les mammifères (primates, porc, humain, bovins et porcs), le ST4 chez l'homme et chez les rongeurs et les ST6, ST7 et ST8 chez l'homme et chez les oiseaux. Certains STs se trouvent exclusivement chez les animaux (ST10-ST17). ST10 et ST15 sont présents chez les artiodactyles et les primates non humains, ST11 chez les proboscidiens, ST12 chez les artiodactyles et les marsupiaux, ST13 chez les primates non humains et les marsupiaux, ST14 chez les artiodactyles, ST16 chez les marsupiaux et ST17 chez les rongeurs.

chameaux en Lybie (Alfellani et al. 2013a). D'autre part, le nombre d'études menées chez l'homme étant beaucoup plus important, cela peut entraîner un premier biais dans cette analyse synthétique. Un second biais pourrait être l'exposition plus fréquente de l'homme au parasite du fait de son mode de vie, de ses déplacements, de ses nombreuses interactions avec les animaux et de ses habitudes alimentaires très diversifiées.

### **VII. Les autres modes de transmission de *Blastocystis* sp.**

La prédominance des ST1 à ST4 dans la population humaine peut clairement s'expliquer par une large transmission inter-humaine. Cette transmission est sans nul doute indirecte via différents supports comme l'eau et les aliments et est évidemment étroitement liée aux conditions et règles d'hygiène de la population. Mais cette transmission inter-humaine n'a pour l'instant été mise en évidence que dans très peu d'études réalisées au sein de petites communautés. Nagel et al. (2012) ont par exemple montré que 16 des 17 membres d'une famille étaient infectés par les mêmes STs de *Blastocystis* sp. De même, Pipatsatitpong et al. (2012) ont démontré que des orphelins vivant dans la même pièce que des surveillants infectés par *Blastocystis* sp. avaient plus de risque d'être infectés que des orphelins vivant dans une autre pièce avec des surveillants non infectés. Dans une résidence de jeunes filles de Bangkok en Thaïlande, la prévalence du ST1 atteignait presque 95% suggérant là encore une transmission inter-humaine dans cet espace restreint (Thaithaisong et al. 2013). Dans une enquête épidémiologique menée dans des villages de taille réduite en Malaisie (Anuar et al. 2013), les membres infectés d'une famille représentaient un facteur de risque significatif de transmission du parasite aux autres membres de cette famille. De plus, Yoshikawa et al. (2000) ont mis en évidence une transmission inter-humaine du ST3 entre patients et personnels de soins dans deux établissements de santé. En dehors de ces contacts « directs », les supports de transmission sont bien entendu l'eau et les aliments souillés par les kystes du parasite. A ce jour, aucune donnée ne peut réellement être avancée concernant des épisodes d'épidémies via la consommation d'eau ou d'aliments contaminés par *Blastocystis* sp. (Baldursson et Karanis 2011). Cela peut aisément s'expliquer par le fait que ce parasite n'est généralement pas recherché dans le cadre de ces épisodes et qu'on observe un portage déjà important dans la population. Cependant, Wu et al. (2000) ont décrit une épidémie en 1996 dans la province de Jiangxi en Chine avec 1122 cas recensés de diarrhée en 8 jours. Une eau contaminée par *Blastocystis* sp. aurait été la source probable de l'infection mais aucune donnée moléculaire n'a permis de le confirmer. De même, une épidémie de gastroentérite

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

touchant 5 personnes d'une même famille en Italie 2 semaines après avoir ramené 2 enfants d'Inde pour une adoption serait aussi probablement liée à une infection à *Blastocystis* sp. (Guglielmetti et al. 1989).

Plusieurs études ont donc visé à rechercher le parasite dans ces sources de contamination afin d'évaluer le risque réel de transmission. On peut ainsi citer un certain nombre d'enquêtes épidémiologiques récentes dans lesquelles des analyses statistiques suggèrent qu'une eau de mauvaise qualité ou non bouillie et des boissons mal conservées ainsi que la consommation de nourriture à risque (légumes crus ou non lavés, allaitement maternel...) représentent des facteurs de risque d'infection à *Blastocystis* sp. (Li et al. 2007a ; Dagci et al. 2008 ; Leelayoova et al. 2008 ; Velasco et al. 2011 ; Abdulsalam et al. 2012 ; Lee et al. 2012b ; Anuar et al. 2013 ; Tandukar et al. 2013 ; Londono-Franco et al. 2014). Pour la plupart de ces études, la prudence est de mise car la prévalence du parasite a généralement été déterminée par une méthode microscopique peu sensible et de ce fait les analyses statistiques sont en relation avec ces données. Cependant, plusieurs auteurs ont pu identifier le parasite dans l'eau et les aliments par différentes méthodes de détection. Ainsi Cruz Licea et al. (2003) ont montré que dans un quartier de la ville de Mexico, 41,7% des vendeurs de viande étaient infectés par *Blastocystis* sp. et que cette valeur était largement supérieure à celle observée dans la population globale. Pour ces auteurs, les vendeurs se contaminent en manipulant la viande mais peuvent aussi transmettre le parasite aux consommateurs de cette même viande. Des prévalences similaires ont aussi été observées chez ces vendeurs dans la ville de Cascavel au Brésil (28,2%) (Takizawa et al. 2009) et à Alexandrie en Egypte (35,5%) (Fathy 2011). En parallèle, des réservoirs d'eau de consommation courante ont été testés chez des particuliers dans plusieurs districts de la ville d'Alexandrie en Egypte et 12% des échantillons étaient positifs pour *Blastocystis* sp. (Khalifa et al. 2001). Suresh et al. (2005) ont par la suite analysé des eaux usées avant et après traitement en Grande-Bretagne et en Malaisie et montré d'une manière surprenante que 50% des affluents et 28% des effluents contenaient des kystes viables de *Blastocystis* sp. c'est à dire des formes cultivables. Ces données démontraient d'abord l'inefficacité des traitements classiques des eaux usées qui ne détruisaient pas les kystes du parasite puisqu'ils se retrouvaient dans les effluents. Elles confirmaient ensuite des études préalables concernant la résistance des kystes aux méthodes classiques de traitement des eaux par chlorination et ozonation (Moe et al. 1996 ; Zaki et al. 1996 ; Khalifa et al. 2001). Une étude similaire a été réalisée aux Philippines dans laquelle 23% des affluents et 7% des effluents étaient positifs pour *Blastocystis* sp. (Banaticla et Rivera 2011). Les isolats identifiés dans ces derniers échantillons appartenaient aux ST1 et ST2. Or, il faut rappeler que

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

ces mêmes STs sont prédominants dans la population humaine de ce pays (Rivera et Tan 2005). Il est donc évident que l'absence ou une efficacité limitée des structures de traitement des eaux usées apparaît comme une cause majeure de contamination des populations par *Blastocystis* sp. (Nimri et Batchoun 1994 ; Li et al. 2007a ; Ithoi et al. 2011 ; Abdulsalam et al. 2012). Cela explique pourquoi *Blastocystis* sp. a été ajouté en 2006 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à la liste des parasites à rechercher dans le cadre d'une vérification de la qualité de l'eau de boisson ([http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/9789241548151\\_annex.pdf?ua=1](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/9789241548151_annex.pdf?ua=1)).

Dans une école Thaïlandaise, l'analyse de l'eau consommée par des écoliers montrait la présence de *Blastocystis* sp. ST1 (Leelayoova et al. 2008). Or, ce ST était aussi prédominant (80%) parmi les 18,9% d'enfants infectés par le parasite. Ce même ST a aussi été identifié dans 12% des échantillons d'eau du robinet testés dans la région de Cukurova en Turquie et était massivement présent (36%) chez les individus consommant cette eau (Eroglu et Koltas 2010). Au Vénézuéla, *Blastocystis* sp. est très fréquent dans les affluents de la rivière Manzanares dont l'eau est utilisée par les habitants pour les activités domestiques, agricoles et industrielles. Cela indique une contamination fécale et donc un focus d'infection constant pour les populations humaine et animale de la région (Mora et al. 2010). En Malaisie, le parasite a été identifié en moyenne dans 22,1 et 33,3% des échantillons d'eau testés des rivières Sungai Batu et Sungai Congkak localisées dans une zone de loisirs (Ithoi et al. 2011). De manière intéressante, les auteurs ont aussi montré que ces pourcentages augmentaient dans les zones de baignade et durant les vacances suggérant fortement que cette contamination était bien d'origine fécale. Enfin, au Népal, Lee et al. (2012b) ont mis en évidence *Blastocystis* sp. ST1 et ST4 dans deux rivières traversant le village de Bahunipati ainsi que chez les différents animaux de ferme vivant dans ce village. Or, cette étude faisait suite à celle de ces mêmes auteurs dans laquelle ceux-ci mettaient en évidence une très forte prédominance du ST4 chez ces villageois (Lee et al. 2012a).

### **VIII. Des données génomiques récentes concernant *Blastocystis* sp.**

Les données génomiques d'un organisme constituent une avancée significative vers une meilleure connaissance de la biologie de celui-ci. C'est aussi le cas pour *Blastocystis* sp. qui apparaît aujourd'hui comme un pathogène émergent de premier ordre ayant un impact clinique majeur. L'existence d'isolats résistants aux traitements thérapeutiques, son mode de

contamination (oro-fécale) et son potentiel zoonotique facilitent grandement sa dissémination. De plus, *Blastocystis* sp. dispose de quelques atouts lui permettant non seulement de survivre dans l'environnement intestinal mais également de s'y multiplier d'où l'intérêt des séquençages récents du génome nucléaire de *Blastocystis* sp. ST7 et du génome mitochondrial d'isolats appartenant à plusieurs STs. Ces séquençages constituent de plus la base pour le développement de nouveaux outils de sous-typage.

### VIII.1. Quelques généralités sur le génome nucléaire

Les résultats du séquençage et de l'assemblage du génome d'un isolat de *Blastocystis* sp. ST7 ont permis de déterminer sa taille qui est d'environ 18,8 Mpb. Cette taille fait de ce génome le plus petit génome de Straménopile séquencé à ce jour (*Phytophthora infestans*, 240 Mpb ; *P. sojae*, 95 Mpb ; *Thalassiosira pseudonana*, 34,5 Mpb) (Denoeud et al. 2011). L'annotation du génome a mis en évidence un nombre restreint de gènes (6020) représentant environ 42% de la totalité du génome. Ce pourcentage sous-entend l'existence de régions inter-géniques courtes qui sont en moyenne de l'ordre de 2 kb. Dans ce génome, un total de 31 unités ADNr ont été retrouvées. Chacune s'organise en une petite sous-unité ADNr 18S de 1.8 kb, une unité ADNr 5.8S de 2.45 kb et une grande sous-unité ADNr 28S de 0.44 kb. Comme indiqué précédemment, le gène de l'ADNr 18S est le marqueur utilisé pour le sous-typage des isolats. Or, l'alignement des séquences complètes de 17 des gènes d'ADNr 18S de *Blastocystis* sp. ST7 a montré un important polymorphisme intra-génomique. En effet, le polymorphisme de ce gène se traduit par un pourcentage d'homologie entre les différentes copies allant de 91% à 99% (Poirier et al. 2014). Cette valeur suggère que ce gène n'est probablement pas un marqueur de choix pour différencier des isolats appartenant à un même ST d'où le développement de nouveaux marqueurs dans ce contexte précis (Poirier et al. 2014). Ce génome comporte en outre une large proportion de gènes dupliqués (19% des gènes au total), probablement issus d'une duplication complète du génome ou de duplications segmentaires, suivies de réarrangements. Un autre mécanisme, important en termes d'évolution génomique, mis en évidence chez *Blastocystis* ST7, est le transfert horizontal de gènes. L'analyse des données a permis d'identifier 133 gènes candidats présentant exclusivement des homologies de séquences avec des gènes bactériens et d'archaea. Il semble également que ce ST ait acquis quelques gènes par transfert horizontal entre eucaryotes.

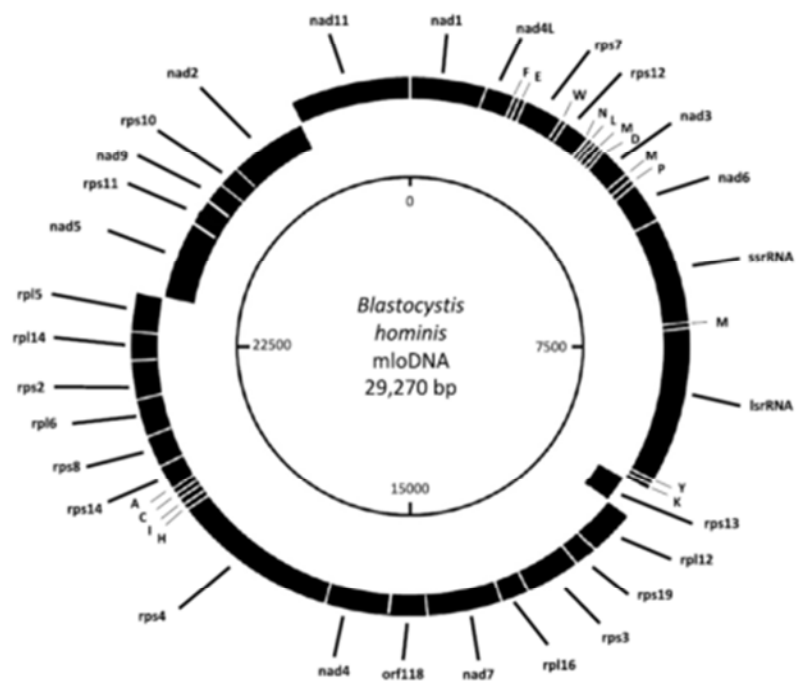
### VIII.2. Le génome mitochondrial

Trois génomes de MLOs d'isolats appartenant à 3 STs différents ont été publiés presque simultanément en l'occurrence ceux de ST1, ST4 (Pérez-Brocal et Clark 2008) et ST7 (Wawrzyniak et al. 2008) (**Figure 18**). Ces 3 génomes ont une taille comprise entre 27 et 29 kb et présentent plusieurs caractéristiques « mitochondriales » comme un pourcentage riche en AT de l'ordre de 80 %, une forte densité génique, des régions intergéniques très courtes et la présence de gènes codant des sous-unités du complexe I de la phosphorylation oxydative. En revanche, les gènes codant les autres complexes de la phosphorylation oxydative habituellement présents dans les mitochondries aérobies sont absents de ce génome mitochondrial (II, III, IV, ATP synthase). Cet aspect illustre une réduction génomique probablement liée aux contraintes environnementales, le parasite s'étant débarrassé des gènes non essentiels pour sa survie en anaérobiose. On retrouve également en copie unique des gènes codant pour les ARNr de type « mitochondrial » au sein de ces 3 génomes (grande sous-unité « lsrRNA » et petite sous-unité « ssrRNA »). Celui codant pour l'ARNr de la petite-sous unité a d'ailleurs récemment été utilisé comme marqueur de génotypage (Poirier et al. 2014). D'autre part, le nombre réduit de gènes d'ARNt identifiés dans le génome mitochondrial suggère que les ARNt de certains codons sont codés par le génome nucléaire et importés du cytoplasme.

### IX. Les molécules et mécanismes impliqués dans la pathogénicité de *Blastocystis* sp.

#### IX.1. La prédiction de protéines impliquées dans les interactions hôte-parasite

L'analyse des données génomiques de *Blastocystis* sp. ST7 et du sécrétome prédit *in silico* a permis d'identifier plusieurs protéines pouvant jouer un rôle dans la virulence du parasite (Denoeud et al. 2011). Ainsi, des gènes probablement d'origine bactérienne codent des transporteurs de la famille des MFS (Major Facilitator Superfamily) qui pourraient être impliquées dans le processus de capture des nutriments par le parasite dans le tube digestif facilitant ainsi la colonisation de l'hôte. D'autres gènes d'origine bactérienne codent des protéines de types immunoglobuline et cadhérine pouvant être impliquées dans une possible adhésion du parasite à l'épithélium intestinal. Les glycosidases et protéases prédites dans le sécrétome pourraient quant à elle entraîner une détérioration de la barrière mucoale. Cette



**Figure 18 :** Génome circulaire des MLOs de *Blastocystis* sp. ST7 (Wawrzyniak et al. 2008).

Ce génome d'environ 29 kb code notamment pour l'ARNr d'une petite sous-unité ribosomale (ssrRNA) et d'une grande sous-unité ribosomale (lsrRNA).



détérioration serait liée à une perturbation des jonctions serrées suivie par une augmentation de la perméabilité cellulaire de l'épithélium intestinal. Des hydrolases pourraient aussi dégrader le mucus intestinal afin de fournir les nutriments nécessaires au développement du parasite.

Parmi les protéines prédites comme sécrétées, une vingtaine de protéases à cystéine ainsi qu'une protéase à aspartate et une protéase à sérine ont été identifiées. Ces protéases à cystéine sont en particulier connues pour jouer un rôle majeur dans la pathogénicité d'autres microorganismes (Sajid et McKerrow 2002). Des molécules apparentées à des inhibiteurs de protéases tels que la cystatine, l'inhibiteur de protéase de type I, ou encore des inhibiteurs d'endopeptidase ont également été mis en évidence dans le génome de *Blastocystis* sp. ST7. L'inhibiteur de protéase de type 1 permettrait l'inhibition d'enzymes de l'hôte telle que la chymotrypsine et donc au parasite de se protéger contre le milieu gastrique (Martzen et Peanasky 1985). La cystatine qui possède une activité d'inhibition des protéases à cystéine, pourrait quant à elle intervenir dans la régulation de l'activité protéase du parasite lui-même. Enfin, *Blastocystis* sp. ST7 possède dans son génome un gène codant potentiellement pour une polykétide synthase (PKS) de type 1. Or, les PKS sont des mégasynthases décrites chez les bactéries et les champignons et impliquées dans la production de métabolites secondaires dont certains sont connus pour avoir une activité anti-microbienne (Park et al. 2010). De ce fait, le parasite pourrait avoir un effet sur le microbiote intestinal de l'hôte et provoquer une éventuelle dysbiose et les troubles digestifs qui en découlent.

### **IX.2. Les données *in vitro* et l'identification de facteurs de virulence**

Plusieurs études ont été réalisées *in vitro* afin de clarifier la physiopathologie de *Blastocystis* sp. C'est d'abord Long et al. (2001) qui ont montré que les cellules de *Blastocystis* sp. étaient capables d'induire tardivement une réponse inflammatoire avec production d'interleukine (IL)-8 et du granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) par des cellules épithéliales de colon humain (HT-29 et T-84). Les auteurs concluent qu'il s'agirait d'un mécanisme permettant au parasite de moduler la réponse immunitaire de l'hôte le temps de son implantation. Des effets similaires ont été observés en utilisant le surnageant de culture du parasite (Long et al. 2001). Cette modulation de la réponse immunitaire est de plus accentuée par la capacité du parasite à dégrader les IgA localisés à la surface de l'épithélium intestinal (Puthia et al. 2005), à réduire la production de monoxyde d'azote intervenant entre autre dans l'immunité innée contre les agents infectieux



(Mirza et al. 2011a) et à induire un déséquilibre de la réponse Th1/Th2 en faveur de la réponse Th2 (Chan et al. 2012). Ces IgA sont dégradés par des lysats cellulaires de *Blastocystis* sp. et en particulier par les protéases à cystéine sécrétées par le parasite (Puthia et al. 2005). Plus récemment, la production d'IL-8 a été décrite comme étant dépendante de la voie de signalisation NF-kB et que celle-ci était induite par ces mêmes protéases à cystéine (Puthia et al. 2008 ; Teo et al. 2014). Cette production permettrait la survie et la dissémination du parasite en causant un afflux de cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse intestinale ce qui contribuerait à la symptomatologie de la blastocystose. Ces mêmes auteurs ont aussi montré que le parasite était capable d'induire l'apoptose des cellules épithéliales de rat IEC-6 entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité intestinale. Ce mécanisme serait contact-indépendant et impliquerait la voie des caspases de l'hôte (Puthia et al. 2006). Cela a été confirmé dans une étude récente menée sur la lignée cellulaire de colon humain Caco-2 (Wu et al. 2014a). Cette induction de l'apoptose n'implique en fait que les caspases 3 et 9 et peut être bloqué en mettant au préalable en contact les cellules Caco-2 avec l'inhibiteur z-VAD-fmk des caspases (Wu et al. 2014a). Cependant, ce mécanisme qui induit une modification de la perméabilité intestinale par un réarrangement des protéines composant les jonctions serrées comme la protéine ZO-1 est clairement ST-dépendant puisque il est observé pour un isolat de ST7 et non pour un isolat de ST4. Dernièrement, Wu et al. (2014b) en utilisant de nouveau des cellules Caco-2 ont démontré que l'attachement du parasite à l'épithélium intestinal représentait une étape cruciale dans la colonisation et la virulence du parasite. Cette adhésion aurait préférentiellement lieu au niveau des jonctions serrées de l'épithélium et induirait un réarrangement des protéines constitutives (ZO-1 et occludine). L'efficacité de cette adhésion serait ST-dépendante et même souche dépendante et corrélée à la sensibilité des souches au métronidazole, première drogue utilisée contre *Blastocystis* sp. (**voir Par. XI**). En effet, les souches les plus résistantes adhèrent de manière moins efficace à l'épithélium et seraient donc moins pathogènes.

Comme indiqué ci-dessus, le parasite est capable d'induire l'apoptose des cellules intestinales de l'hôte. Pourtant, d'autres auteurs ont décrit au contraire un effet pro-prolifératif des antigènes de *Blastocystis* sp. sur des cellules de carcinome colorectal humain HCT116 (Chandramathi et al. 2010) ou l'absence d'effet du parasite sur la prolifération des cellules HT-29 (Long et al. 2001). Cette différence peut vraisemblablement s'expliquer par la variation des modèles cellulaires et des isolats utilisés. En effet, Chan et al. (2012) ont observé sur des cellules HCT116, un effet pro-prolifératif et inflammatoire significativement plus élevé lorsqu'ils utilisent des antigènes d'isolats issus de patients symptomatiques par

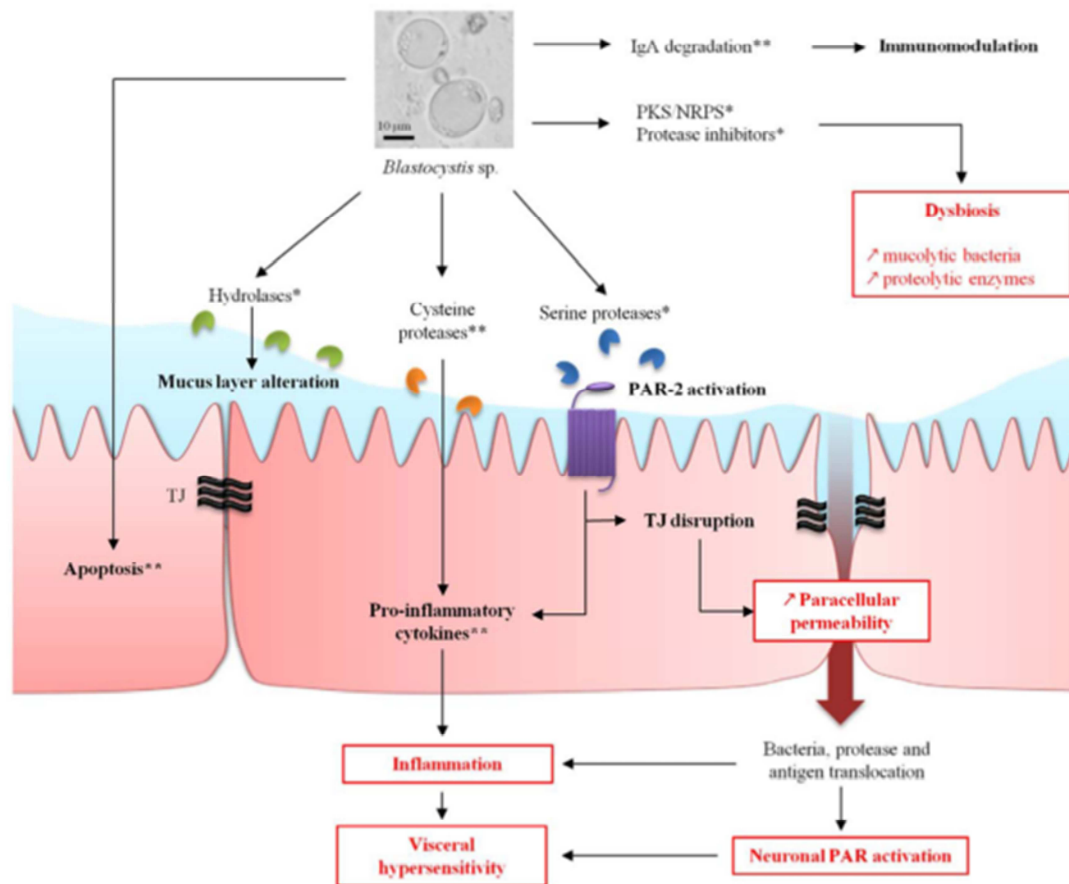
rapport à des antigènes d'isolats issus de patients asymptomatiques. De plus, en comparant des isolats de 5 STs (ST1 à ST5), Kumarasamy et al. (2013) ont montré que les antigènes d'un isolat de ST3 induisent une plus forte prolifération de cellules de carcinome colorectal humain HCT116. De manière intéressante, ce même antigène de ST3 entraîne une surexpression du gène de la cathepsine B sous-entendant une modulation de la réaction immunitaire.

Sur la base des données génomiques et *in vitro*, l'attention des chercheurs concernant de potentiels facteurs de virulence s'est naturellement portée sur les protéases à cystéine. Chez *Blastocystis* sp., ces protéases à cystéine sont localisées principalement dans la vacuole centrale (Puthia et al. 2008) et les variations d'activité protéase à cystéine entre les isolats parasitaires pourrait en partie expliquer l'existence de souches pathogènes ou non pathogènes (Mirza et Tan 2009). Une de ces cystéines protéases a été identifiée comme étant une légumine par Wu et al. (2010). Localisée à la surface du parasite, elle aurait pour rôle d'activer d'autres protéases à cystéine sécrétées par le parasite. Cette légumine a aussi été identifiée par spectrométrie de masse dans le surnageant de culture de *Blastocystis* sp. ST7 avec une seconde protéase à cystéine, la cathepsine B (Wawrzyniak et al. 2012). A la même période, Mirza et al. (2012) ont confirmé que des parasites vivants ou des lysats parasitaires entraînaient une augmentation de la diffusion paracellulaire de macromolécules à travers un tapis de cellules Caco-2. Dans cette étude, les auteurs ont confirmé le rôle des protéases à cystéine dans la désorganisation des jonctions serrées via la phosphorylation des chaînes légères de myosine par les ROCK kinases.

Toutes ces données génomiques et *in vitro* ont permis de proposer un modèle hypothétique de la pathogénicité de ce parasite (Poirier et al. 2012) (**Figure 19**).

### **IX.3. Le développement de modèles animaux de blastocystose et la physiopathologie du parasite**

Un des obstacles majeurs à l'étude de la pathogénicité et de la dynamique d'infection de *Blastocystis* sp. est l'absence d'un modèle animal reproductible. Plusieurs infections expérimentales impliquant différentes espèces animales ont pourtant été décrites (Tan 2008). C'est le cas par exemple du poulet qui a été infecté avec succès après inoculation par voie intra-caecale de plusieurs isolats provenant d'autres oiseaux (poulet, caille, oie) (Tanizaki et al. 2005). Ces mêmes auteurs ont de plus confirmé que la forme kystique était la forme de transmission du parasite et que le principal mode de transmission était la voie oro-fécale. Pour cela, des poulets infectés par *Blastocystis* sp. ont été mis en contact avec des poulets non



**Figure 19 :** Modèle hypothétique de la pathogénicité de *Blastocystis* sp. (Poirier et al. 2012).

Les protéases à cystéine sécrétées par le parasite peuvent dégrader les IgA prédominantes à la surface de l'épithélium intestinal et induire la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces mêmes facteurs de virulence peuvent désorganiser les jonctions serrées de l'épithélium intestinal et augmenter la perméabilité de celui-ci. Des polykétide synthases pourraient entraîner une dysbiose. Enfin, des hydrolases dégraderaient le mucus intestinal. Sont entourés et indiqués en rouge les mécanismes physiopathologiques communs observés ou suggérés dans le cadre du syndrome du côlon irritable et de la blastocystose.

infectés qui deviennent alors rapidement parasités. Des isolats humains appartenant aux STs 4, 6 et 7 sont capables d'infecter expérimentalement des poulets confirmant la faible spécificité d'hôte de certains STs et le potentiel zoonotique du parasite (Iguchi et al. 2007).

Les études les plus nombreuses et concluantes ont été cependant réalisées chez la souris et le rat. Pourtant, la souris ne semble pas un excellent modèle puisque *Blastocystis* sp. n'a encore jamais été identifié chez cet animal. Cependant, Moe et al. (1997) ont montré que l'infection de souris BALB/c immunocompétentes par des kystes (voie orale) ou des formes vacuolaires en culture (voie intra-caecale) d'un isolat humain de *Blastocystis* sp. entraînait une certaine léthargie voire même une perte de poids des animaux. Bien que non invasif, les examens histologiques montraient que *Blastocystis* sp. était capable d'induire une inflammation, des œdèmes et une desquamation de l'épithélium du caecum et du côlon des animaux. Des formes granulaires et vacuolaires furent observées dans le caecum mais seules des formes kystiques étaient retrouvées dans le colon. La sensibilité des animaux à l'infection dépendait de l'âge de la souris. Ainsi les souris âgées de 8 semaines se révélaient toutes insensibles à l'infection (Moe et al. 1997). Les mêmes auteurs ont analysé la pathogénicité de *Blastocystis* sp. après injection intra-musculaire de formes vacuolaires en culture chez des souris BALB/c de 6 à 8 semaines et montré que le parasite pouvait induire une réaction inflammatoire sévère et une nécrose des muscles (Moe et al. 1998). Par inoculation intra-péritonéale d'un isolat humain, Zhou et al. (2010) ont démontré que le parasite pouvait se maintenir pendant plus de six mois sous forme kystique dans la cavité abdominale des animaux. Plus récemment et toujours chez des souris immunocompétentes infectées par des isolats humains, Elwakil et Hewedi (2010) ont mis en évidence une infiltration des formes vacuolaires de *Blastocystis* sp. au niveau de la lamina propria et de la sous muqueuse du côlon des animaux.

Le rat étant porteur naturel du parasite, celui-ci a fait l'objet de plusieurs études complémentaires à commencer par celle de Suresh et al. (1993). Dans cette étude, les auteurs montrent la présence en grand nombre du parasite dans le caecum et le colon de jeunes rat Wistar infectés 7 jours auparavant par des souches humaines de *Blastocystis* sp. Là encore le rôle majeur de la forme kystique dans la transmission du parasite est confirmé comme dans l'étude de Yoshikawa et al. (2004a). Ces derniers auteurs ont en effet infecté des rats avec des formes kystiques d'isolats de rongeurs de ST4 et montré qu'une de ces souches pouvait, chez cet hôte, entraîner une infection chronique pendant plus d'une année. Iguchi et al. (2007) ont ensuite confirmé que le ST4 était capable d'infecter le rat mais aussi le poulet. En 2008, Hussein et al. ont testé chez de jeunes rats Wistar le pouvoir infectieux d'isolats humains de

plusieurs STs. Seuls les rats inoculés avec des isolats symptomatiques présentaient des changements pathologiques classés de modérés à sévères (diarrhée, réaction inflammatoire intense, oedèmes, polypes pré-cancéreux...), certains isolats humains de ST1 entraînant même la mort des animaux (25%). Globalement, ces auteurs observaient une forte pathogénicité du ST1, une absence de pathogénicité du ST2 et la présence de souches pathogènes et non pathogènes pour les STs 3 et 4. Cette étude tendait donc à confirmer le potentiel pathogène de *Blastocystis* sp. comme celui de certains STs mais un bémol doit être apporté car les inocula utilisés dans cette étude provenaient de selles humaines mises en culture en milieu de Jones. De ce fait, la nature des inocula n'a pas été clairement vérifiée même si la recherche de bactéries pathogènes et d'autres parasites a été réalisée. Plus récemment, Li et al. (2013) ont infecté des rats de 6 semaines avec différentes doses d'un isolat humain symptomatique de ST1 et montré que le développement de l'infection n'était pas dose-dépendant. De plus, selon les doses de parasites, les auteurs parlent d'inflammation, d'œdème, d'érosion de la muqueuse du caecum et du colon voire même d'invasion de la lamina propria par le parasite chez les animaux. Or, aucune image de ces altérations histologiques n'a été malheureusement présentée par les auteurs.

### **X. L'impact de *Blastocystis* sp. en santé humaine et quelques aspects cliniques**

Au cours des 20 dernières années, le pouvoir pathogène de *Blastocystis* sp. a été largement débattu dans la littérature (Stenzel et Boreham 1996 ; Tan et al. 2002, 2010 ; Tan 2004, 2008 ; Boorom et al. 2008 ; Stensvold et al. 2009b; Scanlan 2012 ; Parija et Jeremiah 2013 ; Scanlan et Stensvold 2013 ; Wawrzyniak et al. 2013 ; Roberts et al. 2014). Ceci est principalement dû au fait que ce parasite peut être fréquemment trouvé chez des patients asymptomatiques. Cependant, *Blastocystis* sp. est aussi le seul parasite identifié chez de très nombreux patients présentant entre autres des troubles intestinaux et l'élimination du parasite entraîne généralement la disparition des troubles. Chez les patients symptomatiques, la maladie prend le nom de « blastocystose ». Les troubles digestifs associés à la blastocystose ne montrent aucun caractère particulier puisqu'il s'agit le plus souvent de diarrhées, de vomissements, de douleurs abdominales et de ballonnements. Cette distribution symptomatique a été signalée pour la première fois dans une étude de 239 patients en provenance d'Arabie Saoudite en 1989 (Qadri et al. 1989). Cette diarrhée peut être chronique même chez un individu immunocompétent (Shah et al. 2012). L'interprétation des données épidémiologiques issues de la littérature quant à la pathogénicité de ce parasite reste toujours

délicate du fait de plusieurs biais possibles. En effet, dans la plupart des études, aucune recherche d'autres entéro-pathogènes bactériens et viraux n'est réalisée et on observe souvent l'absence d'un groupe contrôle non infecté. De plus, les outils de diagnostic utilisés dans certaines enquêtes peuvent être peu sensibles (observation microscopique) et les études portent la plupart du temps sur des cohortes englobant un nombre limité d'individus.

### **X.1. Blastocystose et immunodépression**

*Blastocystis* sp. est de plus en plus impliqué dans les maladies diarrhéiques en particulier chez les individus immunodéprimés en faisant ainsi un parasite opportuniste de premier plan (Cirioni et al. 1999 ; Tan et al. 2002 ; Tan 2008). Des prévalences importantes du parasite ont ainsi été récemment observées chez des patients immunodéprimés atteints du VIH (Prasad et al. 2000 ; Kurniawan et al. 2009 ; Tan et al. 2009 ; Davis et al. 2010 ; Idris et al. 2010 ; Alemu et al. 2011 ; Stensvold et al. 2011 ; Agholi et al. 2013 ; Tian et al. 2012, 2013 ; Adamu et al. 2013 ; Rivero-Rodriguez et al. 2013 ; Sanchez-Aguilon 2013 ; Paboriboune et al. 2014). Par exemple, la prévalence de *Blastocystis* sp. atteint 72,4% chez les adultes VIH en Indonésie (Kurniawan et al. 2009). En Ethiopie, Alemu et al. (2011) ont même montré que *Blastocystis* sp. était détecté chez 10,5% des patients VIH mais absent dans la population contrôle non infectée par le virus. Dans toutes ces cohortes, *Blastocystis* sp. est souvent le parasite eucaryote unicellulaire le plus fréquent. Dans ces mêmes populations, plusieurs travaux ont montré une corrélation entre la prévalence de *Blastocystis* sp. et un taux de lymphocytes T CD4 inférieur à 200/mm<sup>3</sup> (Kurniawan et al. 2009 ; Agholi et al. 2012 ; Adamu et al. 2013 ; Paboriboune et al. 2014). La prévalence de *Blastocystis* sp. peut aussi être importante chez des patients immunodéprimés atteints de cancer en particulier colorectaux (Tasova et al. 2000 ; Tan et al. 2009 ; Kumarasamy et al. 2014), chez les transplantés rénaux ou hépatiques (Batista et al. 2011) et chez les patients dialysés (Kulik et al. 2008 ; Gil et al. 2013 ; Karadag et al. 2013). De plus, Chandramathi et al. (2012) ont détecté *Blastocystis* sp. chez des patients cancéreux sous chimiothérapie alors que ceux-ci n'étaient pas infectés avant leur traitement. On note aussi une forte prévalence chez des enfants immunodéprimés atteints de cancer, de maladies chroniques, sous corticostéroïdes ou atteints de malnutrition (Abdel-Hafeez et al. 2012).

### **X.2. Blastocystose et syndrome du côlon irritable, colite et autres troubles digestifs**

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

L'IBS est une colopathie chronique fonctionnelle très courante en particulier dans les pays industrialisés et dont l'impact sur la qualité de vie des patients est majeur (Longstreth et al. 2006). Or, dans ce type de pathologie, le rôle probablement significatif de protozoaires intestinaux comme *Blastocystis* sp. reste très discuté (Stark et al. 2007). En effet, plusieurs études épidémiologiques ont d'abord rapporté de fortes prévalences de ce parasite chez les patients IBS (Giacometti et al. 1999 ; Hussain et al. 1997 ; Yakoob et al. 2004, 2010a,b ; Windsor 2007 ; Stensvold et al. 2009b ; Dogruman-Al et al. 2010 ; Fouad et al. 2011 ; Ramirez-Miranda et al. 2010 ; Cekin et al. 2012 ; Jimenez-Gonzalez et al. 2012 ; Mumcuoglu et al. 2013). Par exemple, dans une étude récente menée en Turquie par Dogruman-Al et al. (2010) qui excluait les patients présentant d'autres protozoaires et bactéries intestinaux pathogènes, il a été montré que 76% des patients IBS étaient infectés par *Blastocystis* sp. Cependant, dans ce genre d'études épidémiologiques et du fait de la complexité d'une telle pathologie, il est très difficile de pouvoir déterminer un groupe contrôle pour ces enquêtes et de proposer un lien causal entre la prévalence du parasite et cette colopathie chronique. D'autre part, la plupart des symptômes attribués à une infection par *Blastocystis* sp. sont similaires à ceux observés dans les cas d'IBS (diarrhée, vomissements, crampes abdominales et ballonnements) ce qui peut s'expliquer par des mécanismes physiopathologiques communs comme suggéré par Poirier et al. (2012) (**Figure 19**). Trois hypothèses peuvent expliquer cette association entre infection à *Blastocystis* sp. et IBS. La première est que *Blastocystis* sp. pourrait être directement responsable de la symptomatologie observée. En effet, on sait qu'une partie des patients souffrant d'IBS déclare la maladie après un épisode infectieux (IBS post-infectieux ou PI-IBS). Dans la seconde hypothèse, le parasite serait indirectement responsable de la symptomatologie en induisant une modification de la microflore digestive qui est maintenue connue chez les patients IBS. Enfin la dernière hypothèse serait que les modifications du transit intestinal et de la microflore digestive chez ces patients favoriseraient l'implantation du parasite qui ne serait alors qu'un « marqueur » de ces troubles.

Pour poursuivre avec les troubles digestifs pouvant être liés à une infection par *Blastocystis* sp., plusieurs auteurs ont identifié ce parasite dans des cas de simple colite (Lucia et al. 2007), de colite hémorragique (Carrascosa et al. 1996), de colite ulcéreuse (Yamamoto-Furusho et Torijano-Carrera 2010 ; Tai et al. 2011) et d'iléite (Tsang et al. 1989). Dans tous ces cas, on observe une résolution des symptômes après traitement des patients par le métronidazole. *Blastocystis* sp. est aussi impliqué dans plusieurs cas cliniques décrivant un patient atteint de diarrhée sévère et de déshydratation (Levy et al. 1996) ou deux enfants montrant des douleurs gastriques aiguës et traités avec succès avant laparotomie (Andiran et





**Figure 20 :** Endoscopie réalisée chez un patient atteint de blastocystose et mise en évidence d'un large ulcère du caecum (Janarthanan et al. 2011).



**Figure 21 :** Lésions cutanées généralisées sur le tronc et les extrémités d'un patient atteint de blastocystose (Vogelberg et al. 2010).



al. 2006). Ce parasite a aussi été identifié dans le liquide péritonéal d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome digestif et d'une perforation de l'intestin (Patino et al. 2008) mais aussi chez d'autres patients dans le liquide contenu dans des kystes spléniques (Santos et al. 2014) et dans le liquide aspiré par endoscopie de l'iléon et du caecum (Matsumoto et al. 1987).

*In vivo*, les observations par endoscopie et biopsie n'ont pas clairement montré d'invasion de la muqueuse du colon humain par *Blastocystis* sp. même si des oedèmes et inflammations de la muqueuse intestinale peuvent être visibles (Guglielmetti et al. 1989 ; Garavelli 1991 ; Zuckerman et al. 1994 ; Chen et al. 2003). Cette inflammation induite par le parasite entraîne une altération des jonctions serrées entre les cellules épithéliales et par conséquent des modifications de la perméabilité intestinale (Dagci et al. 2002) d'où l'apparition éventuelle de troubles. Très peu de données sont en outre disponibles concernant le caractère invasif éventuel du parasite mais Janarthanan et al. (2011) ont montré que l'infection à *Blastocystis* sp. chez un patient de 47 ans était associée à une diarrhée et une inflammation chronique et aigue de la muqueuse du colon ainsi qu'à des ulcères du caecum et du rectum (**Figure 20**). Ce parasite a aussi été détecté dans des ulcères de muqueuses intestinales chez une fillette de 4 ans présentant un saignement rectal (Al-Tawil et al. 1994). Lintong et al. (2012) ont de plus mis en évidence chez un homme de 52 ans une infiltration de la muqueuse et de la sous muqueuse de l'appendice et un remplissage de la lumière de l'appendice d'un patient ce qui a induit par obstruction une appendicite purulente aigue.

### **X.3. Blastocystose et urticaire**

De nombreux cas d'urticaires associés à la présence de *Blastocystis* sp. (**Figure 21**) et régressant après éradication du parasite, ont été rapportés (Levy et al. 1996 ; Kick et al. 2002 ; Valsecchi et al. 2004 ; Pasqui et al. 2004 ; Gupta et Parsi 2006 ; Katsarou-Katsari et al. 2008 ; Hameed et al. 2010 ; Vogelberg et al. 2010 ; Hameed and Hassanin 2011 ; Verma et Delfanian 2013) ainsi qu'une prévalence plus importante du parasite dans une cohorte d'individus atteints de cette pathologie (Zuel-Fakkar et al. 2011 ; Balint et al. 2014). *Blastocystis* sp. a également été observé dans un cas d'angio-œdème avec une identification de ce parasite dans les selles (Micheloud et al. 2007). A ce jour, les mécanismes physiopathologiques permettant d'expliquer la relation entre ce protozoaire digestif et les manifestations cutanées restent encore mal connus. Il a cependant été suggéré que l'apparition des lésions cutanées serait à médiation immunitaire (Dilek et al. 2012). Les antigènes parasitaires pourraient induire

l'activation des lymphocytes de la voie TH2 et la production de cytokines puis celle d'IgE comme dans une réponse allergique.

### **X.4. Une corrélation entre sous-types de *Blastocystis* sp. et pathogénicité des isolats ?**

La corrélation éventuelle entre ST de *Blastocystis* sp. et pouvoir pathogène du parasite est depuis plusieurs années une hypothèse de travail majeure. Aussi, un grand nombre d'études ont cherché à mettre en évidence cette correspondance en analysant différents types de cohortes de patients mais les résultats restent finalement très contradictoires (Tan et al. 2002, 2010 ; Tan 2004, 2008 ; Stensvold et al. 2009b; Scanlan 2012 ; Scanlan et Stensvold 2013 ; Clark et al. 2013 ; Wawrzyniak et al. 2013). Elles sont contradictoires bien sûr entre études quelques fois réalisées dans un même pays mais aussi entre cohortes de patients similaires comme peuvent en témoigner les références citées ci-dessous. Pour des raisons de clarté pour le lecteur, nous n'allons citer que les études ayant mis en évidence cette correspondance entre certains STs de *Blastocystis* sp. et des symptômes digestifs ou des pathologies diverses pouvant être associées à une infection par le parasite.

Concernant d'abord les troubles digestifs, l'apparition de ces différents symptômes serait associée au ST1 pour Yan et al. (2006), Eroglu et al (2009), Yakoob et al. (2010a), Moosavi et al. (2012), Sigidaev et al. (2013) et Thathaisong et al. (2013) et au ST2 pour Roberts et al. (2013a) et Sigidaev et al. (2013). Pour Vassalos et al. (2010), Jones et al. (2009) et Tan et al. (2009), ce serait le ST3 comme pour Abdulsalam et al. (2013a,b) en particulier chez les patients diarrhéiques ce qui est aussi suggéré par Roberts et al. (2013a). Mais pour Stensvold et al. (2011), le ST4 est prédominant chez ces mêmes patients diarrhéiques et plus globalement chez les patients symptomatiques (Dominguez-Marquez et al. 2009).

Concernant maintenant les patients atteints d'urticaire, le ST2 serait prévalent pour Vogelberg et al. (2010) alors que ce serait le ST3 pour Katsarou-katsari et al. (2008), Hameed et al. (2010) et Zuel-Fakkar et al. (2011). Par contre les STs 1 et 2 seraient les plus fréquents pour Sigidaev et al. (2013).

Pour Yakoob et al. (2010a) et Fouad et al. (2011), le ST1 est prédominant chez les patients atteints d'IBS. C'est aussi la conclusion de Jimenez-Gonzalez et al. (2012) qui de plus montrent que le ST3 serait aussi très fréquent chez ces patients. Pour Dogruman-Al et al. (2009), les ST3 et ST2 sont largement majoritaires chez ces patients qui de plus sont atteints de diarrhée chronique.

Enfin, Tan et al. (2009) ont identifié 4 STs différents chez les patients HIV ou atteints de cancer et immunodéprimés avec cependant une prédominance du ST3. D'ailleurs le ST3 serait aussi impliqué dans le déclenchement de la prolifération de cellules cancéreuses humaines colorectales (Kumarasamy et al. 2013).

D'après toutes ces données épidémiologiques, il n'existerait à l'heure actuelle aucun consensus quant à l'implication d'un ST particulier dans le développement de symptômes gastriques ou d'une pathologie digestive précise. On s'orienterait donc plutôt vers l'existence d'isolats pathogènes et non pathogènes pour au moins les 4 principaux STs trouvés chez l'homme. Pourtant, des différences de pouvoir pathogène entre STs ont pu être observées dans le cadre d'expérimentations *in vitro* (**voir Par. IX.2.**) ou du développement de modèles animaux (**voir Par. IX.3.**). Cependant, très peu isolats de certains STs ont été testés et il est donc difficile de pouvoir généraliser les résultats obtenus à des STs entiers.

### **XI. Les traitements de la blastocystose**

Le besoin de traiter des individus infectés par *Blastocystis* sp. est longtemps resté équivoque du fait du pouvoir pathogène controversé de ce parasite (Boorom et al. 2008 ; Tan 2008 ; Stensvold et al. 2010 ; Tan et al. 2010 ; Coyle et al. 2012 ; Clark et al. 2013 ; Sekar et Shanthi 2013 ; Roberts et al. 2014). En général, les traitements contre la blastocystose sont envisagés si le patient présente une diarrhée persistante et si aucun autre pathogène hormis *Blastocystis* sp. est identifié dans les selles du patient. Si tel est le cas, le traitement consiste en l'administration à des doses précises d'une molécule antiparasitaire, le métronidazole, qui est largement utilisée contre les protozoaires parasites anaérobies et qui est généralement efficace contre *Blastocystis* sp. (Nigro et al. 2003 ; Yakoob et al. 2004 ; Cassano et al. 2005 ; Moghaddam et al. 2005 ; Vogelberg et al. 2010 ; Dinleyici et al. 2011 ; Tai et al. 2011). Cependant, cette drogue n'est pas toujours efficace et de nombreux isolats cliniques présentant différents niveaux de « résistance » au métronidazole ont pu être identifiés (Stensvold et al. 2008, 2010 ; Mirza et al. 2011a,b ; Nagel et al. 2012 ; van Hellemond et al. 2012 ; Roberts et al. 2013a) (**Figure 22**). Ces isolats résistants au traitement classique peuvent être d'origine géographique complètement différente (Haresh et al. 1999) et il est possible d'induire cette résistance *in vitro* (Dunn et al. 2012). De plus, cette résistance pourrait être ST-dépendante comme suggéré par Mirza et al. (2011b). En effet, ces auteurs ont montré qu'un isolat de ST7 était résistant au métronidazole alors qu'un autre de ST4 était sensible à cette drogue. Cette résistance pourrait s'expliquer par la présence de gènes codant des

protéines Multi Drug Resistance (MDR) (ABC transporters) dans le génome des isolats comme cela a justement été montré pour un isolat de *Blastocystis* sp. ST7 (Denoeud et al. 2011). Ces protéines sont en effet connues pour conférer une résistance aux drogues chez d'autres protistes parasites (Sauvage et al. 2009) d'où l'intérêt de développer d'autres lignes de traitement et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques chez *Blastocystis* sp. Pour l'instant nous utilisons le terme de « résistance » en considérant que le métronidazole est efficace sur tous les isolats. Ce n'est peut-être pas le cas et on devrait alors parler d'échec thérapeutique. De la même manière, un patient peut être en échec thérapeutique s'il a été réinfecté par le parasite après traitement.

Quoiqu'il en soit, plusieurs autres drogues ont été utilisées le plus souvent en seconde ligne ou en complément du métronidazole et certaines se sont avérées efficaces contre le parasite (**Figure 23**). Parmi ces drogues, la plus commune est sans doute le mélange d'antibiotiques triméthoprine/sulfaméthoxazole représentant les deux composés actifs du Bactrim (Ok et al. 1999 ; Moghaddam et al. 2005 ; Stensvold et al. 2008). D'ailleurs Coyle et al. (2012) proposent d'utiliser le métronidazole en première ligne sur la base des données disponibles dans la littérature, puis d'utiliser en seconde ligne l'association triméthoprine/sulfaméthoxazole. D'autres drogues ont aussi été testées avec un succès relatif comme la furazolidone (Yakoob et al. 2004), le nitazoxanide (Rossignol et al. 2005 ; Speich et al. 2013), le clioquinol (van Hellemond et al. 2012) ou encore la paromomycine qui semblerait prometteuse (Vogelberg et al. 2010 ; van Hellemond et al. 2012).

Antimicrobial Compound (Dose)	Duration of Therapy (d)	Type of Study (n = Number of Study Individuals)	Day Tested Posttreatment (d)	Method of Testing	Blastocystis Eradication	Reference
Iodoquinol (650 mg t.i.d.)	10-20	Clinical survey (n = 5)	28	TS	0%	Markell and Lukow <sup>26</sup>
Ketoconazole (200 mg)	14	Case reports (n = 2)	28	NA	100%	Cohen <sup>27</sup>
MZ (2000 mg s.i.d.)	7	Clinical survey (urticaria patients) (n = 3)	Immediately after completed treatment	FECT	0%	Armentia et al <sup>28</sup>
MZ (1500 mg s.i.d.)	10	Case report (n = 1)	28	NA	100%	Cassano et al <sup>29</sup>
MZ (750 mg t.i.d.)	10	Case report (n = 1)	28	NA	100%	Gupta and Parsi <sup>30</sup>
MZ (750 mg t.i.d.)	10	Case report (n = 1)	NA	NA	100%	Katsarou-Karsari et al <sup>31</sup>
MZ (500 mg t.i.d.)	10	Case report (n = 1)	28	NA	100%	Lucia et al <sup>32</sup>
MZ (250-750 mg t.i.d.)	10	Clinical survey (n = 12)	NA	Direct mount, TS, Kinyoun staining, FECT	33%	Moghaddam et al <sup>33</sup>
MZ (750 mg t.i.d.)	10	Case report (n = 1)	180	Direct mount, floatation, TS, FECT	100%	Nassir et al <sup>34</sup>
MZ (1500 mg s.i.d.)	10	Placebo-controlled treatment trial (n = 76)	30 and 180	TS, FECT	80% MZ, 3% Placebo ( $P < 0.01$ )	Nigro et al <sup>35</sup>
MZ (800 mg t.i.d.)	10	Case report (n = 1)	28 and 150	FECT, TS, culture, PCR	0%	Stensvold et al <sup>36</sup>
Nitazoxanide (200 mg bid children and 500 mg bid adults)	3	Clinical survey (n = 10)	12	Direct smear, FECT	100%	Cabello et al <sup>37</sup>
Nitazoxanide (500 mg bid)	3	Case report (n = 1)	10	Iron-haematoxylin staining, Giemsa staining	100%	Cimerman et al <sup>38</sup>
Nitazoxanide (NA)	NA	Clinical survey of children (2-14 y) (n = 8)	10	Concentration, Kinyoun staining	97%	Diaz et al <sup>39</sup>
Nitazoxanide (100-200 mg bid for children < 12 y; 500 mg bid for > 11 y)	3	Double-Blinded, placebo-controlled treatment trial (n = 84)	Two samples between 4 and 7	Direct smear, FECT	86% NZ and 12% Placebo ( $P < 0.01$ )	Rosignol et al <sup>40</sup>
Ornidazole (500 mg t.i.d.)	7	Clinical survey of Europeans returning from the tropics (n = NA)	14	NA	50%	Hahn and Fetscher <sup>41</sup>
Paromomycin (25 mg/kg t.i.d.)	5-10	Clinical survey (urticaria patients) (n = 7)	Immediately after the treatment	FECT	100%	Armentia et al <sup>28</sup>
Paromomycin (500 mg t.i.d.)	7	Case report (n = 1)	28	NA	100%	Kick et al <sup>42</sup>
Paromomycin (1000 mg bid); MZ (750 mg t.i.d.)	10	Case report (n = 1)	28	NA	100%	Pasqu et al <sup>43</sup>
Paromomycin (25 mg/kg t.i.d.)	10	Case reports (n = 3)	60-90	NA	100%	Valsecchi et al <sup>44</sup>
Trimadazole 2 g or 50 mg/kg/day for < 40 kg	5	Clinical survey (n = 37)	Unknown	MLFC	46%	el Masry et al <sup>45</sup>
TMP/SMX (NA)	10	Clinical survey (n = 9)	Unknown	Direct mount, TS, FECT	22%	Moghaddam et al <sup>33</sup>
TMP/SMX (6 mg/kg TMP, 30 mg/kg SMX s.i.d.)	7	Clinical survey (n = 38)	0	FECT, direct smear, TS, Kinyoun staining	95%	Ok et al <sup>46</sup>
TMP/SMX (320 mg TMP, 1600 mg SMX s.i.d.)	7	Clinical survey (n = 15)	0	FECT, direct smear, TS, Kinyoun staining	93%	Ok et al <sup>46</sup>
TMP/SMX (80 mg trimethoprim/400 mg sulfamethoxazole t.i.d.)	10	Case report (n = 1)	28 and 150	FECT, TS, culture, PCR	100%	Stensvold et al <sup>36</sup>

FECT indicates formal ethyl acetate concentration technique; MLFC, Merthiolate iodine formaldehyde concentration; MZ, metronidazole; NA, information not available; PCR, polymerase chain reaction; s.i.d., once a day; t.i.d., three times a day; TMP/SMX, trimethoprim/sulfamethoxazole; TS, trichrome staining.

**Figure 22 :** Sélection d'études indiquant les drogues utilisées pour éradiquer *Blastocystis* sp. et le taux de réussite de ces traitements (Stensvold et al. 2010).

Drug	Dose
Metronidazole	
Adult dose	750 milligrams thrice daily for 10 days; or 500 milligrams thrice daily for 10 days; or 1.5 grams daily for 7 days
Pediatric dose	15 mg/kg twice daily for 10 days
TMP-SMX	
Adult dose	2 double strength tablets daily for 7 days (320 milligrams TMP: 1600 milligrams SMX)
Pediatric dose	6 mg/kg TMP daily for 7 days
Nitazoxanide	
Adult dose	500 milligrams twice daily for 3 days
Pediatric dose	100–200 milligrams twice daily for 3 days
Paromomycin	25 mg/kg thrice daily for 10 days; 500 milligrams thrice daily for 7 days
Iodoquinol	650 milligrams thrice daily for 10–20 days
Ketoconazole	200 milligrams daily for 14 days
Tinidazole	
Adult dose	2 grams daily for 5 days
Pediatric dose (<40 kg body weight)	50 mg/kg/day for 5 days
<i>Saccharomyces boulardii</i>	250 milligrams twice daily for 10 days

**Figure 23 :** Drogues et doses utiles dans le traitement de la blastocystose (Coyle et al. 2012).

# *Résultats*

---

## I. Prévalence et biodiversité de *Blastocystis* sp. chez l'homme

### I.1. Analyse de la population totale au Liban

**Préambule** : Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal « American Journal of Tropical Medicine and Hygiene ».

#### I.1.1. Introduction

Le Liban est considéré comme un pays très touché par les infections parasitaires intestinales puisque la seule étude d'envergure publiée en 2004 montre une prévalence de ces infections de l'ordre de 33% dans la population Libanaise (Hamze et al. 2004). Cependant, les données de prévalence obtenues dans cette dernière étude n'englobaient pas celle de *Blastocystis* sp. puisqu'il n'avait pas été recherché à ce moment-là. De ce fait, au vue de l'impact potentiel de ce parasite et du manque de données moléculaires le concernant au Moyen-Orient, nous avons alors réalisé ce qui est à notre connaissance la première étude épidémiologique de *Blastocystis* sp. dans ce pays. La prévalence et la distribution des STs du parasite ont été déterminées dans une population de 220 patients Libanais suivis dans 6 hôpitaux de la région de Tripoli et présentant ou non des troubles digestifs. En parallèle, les données cliniques obtenues pour chaque patient ont été analysées afin de rechercher une éventuelle corrélation entre les STs de *Blastocystis* sp. et la présence de symptômes gastro-intestinaux.

#### I.1.2. Résultats

**El Safadi D**, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, Wawrzyniack I, Delbac F, El Alaoui H, Delhaes L, Dei-Cas E, Mallat H, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E (2013) Molecular Epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and Correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 88:1203–1206.



### I.1.3. Conclusions

Dans le cadre de cette enquête, nos premières données épidémiologiques obtenues au Liban montrent une prévalence de *Blastocystis* sp. de 19% (42/220) dans une cohorte de patients symptomatiques ou asymptomatiques vivant au Nord-Liban. Cette prévalence est du même ordre de grandeur que celles observées dans des pays voisins (Rayan et al. 2007 ; Moosavi et al. 2012). Cependant, cette prévalence au Liban est très probablement sous-estimée car basée dans cette étude sur une méthode d'identification du parasite peu sensible en l'occurrence l'observation microscopique de selles fraîches. De ce fait, on peut raisonnablement suggérer que la prévalence actuelle du parasite dans ce pays est plus importante en faisant ainsi un problème potentiel majeur de santé publique. La plupart des isolats de *Blastocystis* sp. identifiés par microscopie (36/42) dans cette enquête ont été ensuite sous-typés. Ainsi, la distribution des STs dans cette population Libanaise est similaire à celles observées dans une grande majorité de pays à travers le monde et en particulier ceux du pourtour méditerranéen (Alfellani et al. 2013c) avec une prédominance du ST3 (34%) suivi des ST1 et ST2 (32% chacun) et du ST4 (3%). Nous confirmons donc que le ST4 est surtout fréquemment trouvé en Europe. En parallèle, une analyse statistique des données cliniques montre une corrélation entre le ST1 de *Blastocystis* sp. et l'apparition de symptômes gastro-intestinaux. Le ST1 est en effet le ST prédominant chez les patients symptomatiques alors que les isolats de ST2 et ST3 sont présents chez les patients symptomatiques et asymptomatiques.

**Short report: Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms**

Dima El Safadi, Dionigia Meloni, Philippe Poirier, Marwan Osman, Amandine Cian, Lobna Gaayeb, Ivan Wawrzyniack, Frederic Delbac, Hicham El Alaoui, Laurence Delhaes, Eduardo Dei-Cas, Hassan Mallat, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze, and Eric Viscogliosi\*

Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, EA4547, Lille, France; Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, Laboratoire Microbiologie, Santé et Environnement, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon; Department of Biomedical Sciences, Division of Experimental and Clinical Microbiology, University of Sassari, Sassari, Italy; Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, CNRS UMR 6023, Clermont Université, Université Blaise Pascal, Aubière, France

\* Address correspondence to Eric Viscogliosi, Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens, EA4547, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France. E-mail : [eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr](mailto:eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr)

Abstract: *Blastocystis* is the most common eukaryotic parasite in the intestinal tract of humans. Due to its potential impact in public health, we acquired the first data concerning the prevalence of this parasite and the frequency of the *Blastocystis* subtypes (STs) in the Lebanese population. In this study, fecal samples from 220 Lebanese symptomatic and asymptomatic patients were collected and a total of 42 patients (19%) were identified as positive for this parasite by direct-light microscopy of smears. Among these, 36 *Blastocystis* isolates were genotyped using partial small subunit ribosomal RNA gene sequencing. ST distribution in the present Lebanese population was as follows: ST3 (33.3%), ST2 (33.3%), ST1 (30.6%) and ST4 (2.8%). These data were compared to those available in other Middle Eastern and neighboring countries. Finally, ST1 was significantly more prevalent among symptomatic patients of this Lebanese population.

*Blastocystis* is the most common intestinal parasite of humans and a wide range of animals with a worldwide distribution.<sup>1</sup> Its prevalence can reach 30% to 60% in developing countries and 1.5% to 20% in industrialized countries.<sup>1</sup> Even if the clinical significance of this parasite remains controversial, *Blastocystis* has been correlated with various gastrointestinal symptoms. It may also play a significant role in irritable bowel syndrome (IBS) and has been linked with urticaria.<sup>2-6</sup> According to recent *in vivo* and *in vitro* studies as well as genomic data, a model for pathogenesis of this parasite was proposed, mainly involving cysteine proteases secreted by the parasite.<sup>5-7</sup> *Blastocystis* organisms found in different hosts are morphologically indistinguishable. However, this genus exhibits an extensive genetic diversity and at least 13 subtypes (STs) have been described on the basis of molecular data<sup>8-10</sup>, which showed sufficient genetic divergence to be classified as separate species.<sup>11</sup> Moreover, nine of these STs (ST1-ST9) have been isolated from human fecal samples highlighting both the low host specificity of the parasite and its zoonotic potential.<sup>9-11</sup> In the recent literature it is still in debate whether distinct *Blastocystis* STs correlate with the development of gastrointestinal symptoms caused by the parasite.<sup>1,4,5,12,13</sup> Moreover, information on the distribution of STs in some geographic locations including Middle Eastern countries is only starting to emerge. Therefore, the aim of the present study was to acquire the first epidemiological data regarding the prevalence of *Blastocystis* in the Lebanese population together with the frequency of STs in symptomatic and asymptomatic patients.

To conduct this study, fecal specimens were randomly collected at six hospitals in North Lebanon (Nini Hospital, Governmental Hospital of Tripoli, Tripoli Center for Medical Analysis, Hamidi Medical Center, Monla Hospital and Saydet Zgharta Hospital) from 220 patients living in or in the vicinity of Tripoli during the period of March-April 2011. These patients were followed up for different pathologies such as gastrointestinal symptoms or presented for routine medical checkups. Stool samples were subsequently examined by direct-

light microscopy of smears (DLM) for the presence of *Blastocystis* at the Centre AZM of Tripoli. No information was available on potential viral or bacterial infections. Genomic DNA was directly extracted from fecal samples positive for *Blastocystis* by DLM using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Each sample was amplified by non-quantitative PCR (non-qPCR) as previously described using two independent pairs of *Blastocystis*-specific primers<sup>14,15</sup>, both targeting the small subunit (SSU) rDNA coding region. The respective 600 bp and 520 bp-amplified domains have been shown to provide sufficient sequence information to discriminate between *Blastocystis* STs.<sup>14,15</sup> For each DNA sample, the non-qPCR product with the highest intensity on agarose gel was purified and cloned as previously described.<sup>16</sup> Two clones containing inserts of approximately the expected size were arbitrarily selected for each sample and sequenced. DNA samples negative by non-qPCR were subsequently amplified using the highly sensitive real-time quantitative PCR (qPCR) assay developed by Poirier and others.<sup>17</sup> The expected 320 bp-amplified variable region of the SSU rRNA gene was directly sequenced for subtyping. To compare the subtyping data obtained by molecular methods, 7 DNA samples were amplified by both non-qPCR and qPCR methods. The SSU rRNA gene sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession numbers KC294143 to KC294196. These new sequences were aligned with the use of the BioEdit v7.0.1 package (<http://www.mbio.ncsu.edu:BioEdit/bioedit.html>) then compared with all the *Blastocystis* SSU rRNA gene sequences available from the NCBI using the BLAST program. Subtypes were identified by determining the closest similarity against all known *Blastocystis* STs according to the last classification by Stensvold and others.<sup>8</sup>

A total of 42 patients (19%) were positive for *Blastocystis* by DLM. This high prevalence was in the same range as those observed in other neighboring countries such as Egypt and Iran.<sup>18,19</sup> It could roughly reflect the overall carriage rate of the parasite in the

Lebanese population because most patients included in the present study were followed up for various pathologies other than intestinal or were asymptomatic. However, the prevalence of *Blastocystis* in our Lebanese population was more likely underestimated since several authors<sup>15,17</sup> pointed out the poor sensitivity of DLM compared to either non-qPCR or qPCR assays. This strongly suggested that the actual prevalence of *Blastocystis* in Lebanon might be much higher making this parasite a potential major problem in public health.

Among the 42 positive samples by DLM, 6 were unsuccessfully amplified by either non-qPCR or qPCR due probably to the presence of known PCR inhibitors in fecal samples. The remaining 36 isolates were collected from 15 females and 21 males, ranging in age from 1 to 83 years (Table 1). The symptomatic group consisted of 19 patients presenting variously with diarrhea, abdominal pain, vomiting, constipation, some in association with fatigue and fever. As previously reported<sup>1,5</sup>, abdominal pain and diarrhea were the two major symptoms among *Blastocystis*-positive Lebanese patients. The asymptomatic group was comprised of 17 individuals without any gastrointestinal symptoms. Each of the SSU rDNA gene sequences obtained from the 36 isolates showed 98% to 100% identity to representative sequences of *Blastocystis* STs reported so far, allowing the direct subtyping of these isolates (Table 1). For 8 of the 19 positive samples for which a 600 bp or 520 bp- fragment of the SSU rRNA gene was cloned, the two sequenced clones were identical (Table 1). Clones showed one to four nucleotide differences for 10 of the remaining samples that could be explained by sequence variations between SSU rDNA gene copies within the same isolate.<sup>7,16,20</sup> For the last sample DS25 (ST3), there were 10 nucleotide differences between both clones suggesting a possible coinfection of the patient with two variants within the same ST. In this regard, substantial intra-ST diversity has been recently demonstrated in ST3.<sup>20</sup> The 7 samples amplified by non-qPCR and qPCR yielded identical subtyping results.

All the 36 samples genotyped in this study represented single infections. As shown in Table 1, ST3 (33.3%) and ST2 (33.3%) were the most common in our Lebanese population followed by ST1 (30.6%) and ST4 (2.8%). In most countries around the world, a majority of human *Blastocystis* infections were attributable to ST3 isolates.<sup>16</sup> This was also the case in the Lebanese population even if the frequencies of ST1 and ST2 were identical or roughly similar to that of ST3. The ST distribution in Lebanon can now be compared to those of other Middle Eastern countries such as Iran<sup>19</sup> and to neighboring countries like Turkey<sup>21,22</sup> and Egypt.<sup>23,24</sup> In these countries, ST1 was the second most common variant after ST3 while it follows at third position in Lebanon but still has a high frequency. ST2 was globally poorly represented in Iran and Egypt whereas it was commonly found in Turkey and Lebanon. In addition, in our Lebanese population only 1/36 isolates has been genotyped as ST4. This ST has not been found in Egypt and Iran and was only identified in a single patient in Turkey. Overall ST4 is common in Europe<sup>25</sup> and much less frequent or absent in other geographical regions. In summary, our data showed a prevalence of ST1, ST2, and ST3 and a virtual absence of ST4 in the Middle Eastern and neighboring countries as well as some geographic variation in the frequency of ST2 that might reflect different exposure to animal and/or environmental infection sources.

To evaluate the pathogenic potential of the different *Blastocystis* STs in our Lebanese population, the phylogenetic distribution of the 36 genotyped isolates from symptomatic and asymptomatic individuals was examined. ST3 (8 of 12 isolates) and ST2 (7/12) were dominant in the asymptomatic group reinforcing the hypothesis that most isolates of these subtypes are likely to be non pathogenic.<sup>5</sup> The single ST4 isolate of our study was asymptomatic while ST4 has been shown to be common in patients with acute diarrhea.<sup>26</sup> Strikingly 10/11 ST1 isolates composed the symptomatic group and a statistical analysis done with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) using the Fisher's

exact test showed a significant association between ST1 and gastrointestinal symptoms ( $p=0.0113$ ). Recently, epidemiological surveys have reported the frequency of STs from symptomatic and asymptomatic individuals in China,<sup>27</sup> Turkey,<sup>28</sup> and Iran<sup>19</sup> and showed that ST1 was over-represented in groups of symptomatic patients. Moreover ST1 was the most prevalent ST of *Blastocystis* in patients with IBS<sup>24,29</sup> and human ST1 isolates were associated with elevated pathogenicity in experimentally infected rats.<sup>30</sup> However, patient symptomatic status was uncorrelated with *Blastocystis* ST and symptoms in the context of several other epidemiological studies.<sup>16,21,31,32</sup>

To our knowledge this is the first investigation of prevalence and molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon. In this country, the prevalence of this parasite would be high with predominance of ST3, ST2 and ST1 isolates. A consistent link between ST1 and gastrointestinal symptoms was identified and should be confirmed in further studies including a larger number of patients.

Acknowledgments : This work was supported by grants from the Programme Orientations Stratégiques from the University of Lille 2, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the Institut Pasteur of Lille. DES and MO were both supported by PhD fellowships from the Conseil National de la Recherche Scientifique and the Azm & Saade Association from Lebanon, and DM by a PhD fellowship from the Regione Autonoma della Sardegna.



## REFERENCES

1. Tan KSW, 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 21: 639-665.
2. Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS, 2008. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors* 1: 40.
3. Katsarou-Katsari A, Vassalos CM, Tzanetou K, Spanakos G, Papadopoulou C, Vakalis N, 2008. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm Venereol* 88: 80-81.
4. Stensvold CR, Nielsen HV, Molbak K, Smith HV, 2009. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends Parasitol* 25: 23-29.
5. Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, Wu B, MacAry PA, 2010. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep* 12: 28-35.
6. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H, 2012. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog* 8: e1002545.
7. Denoeud F, Roussel M, Noël B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier-Armamet C, Couloux A, Poulain J, Segurans B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng GC, Tan KSW, Antiguenave F, Jaillon O, Aury J, Delbac F, Wincker P, Vivarès CP, El Alaoui H, 2011. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol* 12: R29.
8. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG, 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes-a consensus. *Trends Parasitol* 23: 93-96.

9. Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG, 2009. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol* 39: 473-479.
10. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RC, 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol* 169: 8-17.
11. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E, 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol* 43: 348-355.
12. Scanlan PD, 2012. Blastocystis: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol* 28: 327-334.
13. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KE, Arendrup MC, Nielsen HV, Molbak K, 2009. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect* 137: 1655-1663.
14. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG, 2006. DNA barcoding of *blastocystis*. *Protist* 157: 77-85.
15. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV, 2007. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59: 303-307.
16. Souppart L, Sanciú G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E, Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E, 2009. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res* 105: 413-421.

200 17. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V, 2011. Development  
201 and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis*  
202 parasites in human stool samples: prospective study of patients with haematological  
203 malignancies. *J Clin Microbiol* 49: 975-983.

204 18. Rayan HL, Ismail OA, El Gayar EK, 2007. Prevalence and clinical features of  
205 *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasite  
206 infection. *J Egypt Soc Parasitol* 37: 599-608.

207 19. Moosavi A, Haghighi A, Nazemalhosseini Mojarad E, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H,  
208 Kazemi B, Zali MR, 2012. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from  
209 symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-  
210 012-3085-5.

211 20. Meloni D, Poirier P, Mantini C, Noël C, Gantois N, Wawrzyniak I, Delbac F, Chabé M,  
212 Delhaes L, Dei-Cas E, Fiori PL, El Alaoui H, Viscogliosi E, 2012. Mixed human intra-  
213 and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitol Int* 61: 719-722.

214 21. Dogruman-Al F, Yoshikawa H, Kustimur S, Balaban N, 2009. PCR-based subtyping of  
215 *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major  
216 hospital in Ankara. *Parasitol Res* 106: 263-268.

217 22. Eroglu F, Koltas IS, 2010. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using  
218 PCR method. *Parasitol. Res.* 107: 841-845.

219 23. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Delbac F, Boorom K,  
220 Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E, 2010. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from  
221 symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res* 106: 505-511.

222 24. Fouad SA, Basyoni MM, Fahmy RA, Kobaisi MH, 2011. The pathogenic role of different  
223 *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome.  
224 *Arab J Gastroenterol* 12: 194-200.

25. Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark GC, Evengard B, 2012. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 1689-1696.
26. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KEP, Nielsen HV, 2011. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* 84: 883-885.
27. Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo X, Chen G, 2006. Genetic variability of *Blastocystis* isolates in China. *Parasitol Res* 99: 597-601.
28. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS, 2009. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol Res* 105: 1589-1592.
29. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R, 2010. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 106: 1033-1038.
30. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM, 2008. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res* 102: 853-860.
31. Özyurt M, Kurt Ö, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR, 2008. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int* 57: 300-306.
32. Jantermtor S, Pinlaor P, Sawadpanich K, Pinlaor S, Sangka A, Wilailuckana C, Wongsena W, Yoshikawa H, 2012. Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. *Parasitol Res* Dec 9. [Epub ahead of print]

TABLE 1

Clinical data and *Blastocystis* subtypes among symptomatic and asymptomatic patients in Lebanon

Patients	Sex/age	Symptoms	<i>Blastocystis</i> ST by non-qPCR*	Nucleotide differences†	<i>Blastocystis</i> ST by qPCR*	Accession no.
DS1	M/71	Diarrhea			1	KC294143
DS2	M/65				3	KC294144
DS3	F/10	Abdominal pain			2	KC294145
		Vomiting				
DS4	M/4	Diarrhea			1	KC294146
		Vomiting				
		Fever				
DS5	M/69	Diarrhea			1	KC294147
		Abdominal pain				
DS6	M/33				2	KC294148
DS7	M/44				1	KC294149
DS8	M/21	Diarrhea			1	KC294150

		Abdominal pain				
		Vomiting				
DS9	M/12	Diarrhea	2 (Sc)	4	2	KC294151-3
		Vomiting				
		Fever				
DS10	M/13	Diarrhea	1 (Sc)	2	1	KC294154-6
		Abdominal pain				
		Fever				
		Fatigue				
DS11	F/27	Diarrhea	2 (Sc)	0		KC294157
DS12	F/23		3 (Sc)	0	3	KC294158-9
DS13	M/60		3 (Sc)	0	3	KC294160-1
DS14	F/30	Abdominal pain	3 (Sc)	0	3	KC294162-3
DS15	M/34	Abdominal pain			3	KC294164
DS16	M/40				2	KC294165
DS17	M/29	Diarrhea			1	KC294166

		Abdominal pain				
DS18	F/6				2	KC294167
DS19	F/31	Abdominal pain	2 (Sc)	0		KC294168
DS20	F/5		3 (St)	1		KC294169-70
DS21	M/51				2	KC294171
DS22	F/83				2	KC294172
DS23	F/20	Abdominal pain	1 (St)	3	1	KC294173-5
		Fatigue				
		Constipation				
DS24	M/3	Diarrhea			1	KC294176
		Abdominal pain				
		Vomiting				
DS25	M/24		3 (Sc)	10		KC294177-8
DS26	F/11	Diarrhea	3 (Sc)	1		KC294179-80
		Abdominal pain				
DS27	F/5	Abdominal pain	1 (St)	1		KC294181-82

		Vomiting				
		Fatigue				
DS28	F/8		4 (Sc)	0		KC294183
DS29	M/8		2 (Sc)	0		KC294184
DS30	M/5	Abdominal pain			2	KC294185
DS31	M/16	Abdominal pain	1 (Sc)	2		KC294186-7
DS32	F/23		3 (St)	1		KC294188-9
DS33	F/22				2	KC294190
DS34	F/40		3 (Sc)	2		KC294191-2
DS35	M/35		3 (St)	0		KC294193
DS36	M/1	Diarrhea	3 (St)	2	3	KC294194-6
		Abdominal pain				

---

\*According to the new standard terminology<sup>8</sup>; (St) and (Sc): non-qPCR using the primer pair described by Stensvold and others<sup>15</sup> and Scicluna and others<sup>14</sup>, respectively

†Determined in the common region of two clones sequenced for each sample



## RESULTATS

---

### I.2. Analyse d'une population de patients diarrhéiques au Liban

**Préambule :** Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de rédaction pour soumission au journal « Parasitology Research ».

#### I.2.1. Introduction

Dans l'étude présentée précédemment (**Par. I.1.**), nous nous sommes intéressés à la prévalence et à la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population totale au Liban. Cette cohorte incluait donc à la fois des patients symptomatiques et asymptomatiques. Pour connaître l'impact réel du parasite dans la population et son lien avec certains symptômes ou certaines pathologies digestives, il était alors intéressant d'analyser sa prévalence dans des cohortes d'individus plus ciblées. C'est ce que nous avons réalisé dans cette seconde étude qui n'englobe que des patients diarrhéiques. De plus, certains patients présentaient d'autres troubles digestifs décrits fréquemment dans la blastocystose tels que des vomissements et des douleurs abdominales ou même de la fièvre. La comparaison des résultats obtenus avec ceux de l'étude précédente pourrait permettre d'associer la présence du parasite à l'apparition des symptômes gastro-intestinaux les plus fréquents.

#### I.2.2. Matériels et méthodes

##### Population étudiée et questionnaire

De Juillet à Décembre 2012, 163 selles de patients ont été collectées dans quatre hôpitaux localisés au centre et à proximité de la ville de Tripoli au Nord-Liban (Hôpital Nini, Hôpital Al-Shifa, Hôpital Al-Youssef et Hôpital Rahal). Tous les patients inclus dans cette étude ont été hospitalisés suite au développement d'une gastro-entérite ou d'autres pathologies accompagnées de diarrhée et éventuellement d'autres symptômes digestifs. Les objectifs et la nature de cette étude ont été expliqués aux participants et un consentement éclairé a été signé par chaque patient. Un questionnaire standard résumant certaines informations comme l'âge, le sexe, le statut socio-économique, les habitudes comportementales, la nature de l'eau consommée, la présence de troubles digestifs, le nombre de selles émises par jour, le contact éventuel avec des animaux et/ou des voyages récents à l'étranger a été complété pour chaque patient (voir **Annexe 1** fiche signalétique vierge).

## RESULTATS

---

### Collecte des échantillons et analyse microscopique des selles

Les échantillons de selles ont été recueillis dans des récipients stériles et contrôlés macroscopiquement pour détecter la présence de mucus, de sang et de vers. L'aspect des selles a été mentionné en considérant qu'une selle diarrhéique est définie comme étant une selle liquide ou molle émise au moins trois fois par jour. Par la suite, un examen microscopique direct à l'état frais des échantillons de selles a été réalisé par deux techniciens expérimentés du Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses applications de Tripoli afin d'identifier des parasites intestinaux tels qu'*Entamoeba*, *Giardia* et bien entendu *Blastocystis* sp. Cette observation d'un frottis de selles a été suivie de la réalisation d'une coloration classique de Ziehl-Neelsen modifiée pour la détection des oocystes de *Cryptosporidium* sp. Aucune information n'était disponible pour ces patients concernant la présence d'infections virales ou bactériennes.

### Extraction d'ADN total à partir des selles

L'ADN total a été extrait des 163 échantillons de selles à l'aide du QIAamp DNA stool Mini Kit (Qiagen®) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 200 à 300 mg de selles fraîches ont été reprises dans un tampon de lyse à 95°C. Les protéines contenues dans le surnageant ont ensuite été digérées par la protéinase K à 70°C. L'ADN total a été absorbé puis purifié sur une membrane de silice et élué dans le tampon fourni dans le kit. Les ADN obtenus ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Lors de chaque extraction, un témoin négatif d'extraction a été réalisé afin de contrôler l'absence de contamination dans les réactifs. La quantité d'ADN dans chaque extrait a été dosée au spectrophotomètre NanoDrop 2000 afin de déterminer si une dilution de l'échantillon était nécessaire avant de réaliser la PCR en temps réel.

### Recherche du parasite par PCR en temps réel

L'identification de *Blastocystis* sp. dans les selles a été réalisée par PCR en temps réel selon la méthode développée par Poirier et al. (2011). Cette PCR cible un fragment du gène de l'ADNr 18S nucléaire dont la taille varie de 320 à 342 pb selon les STs. Brièvement, les amorces utilisées sont les suivantes : Amorce sens BL18SPPF1 5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAA-3' et Amorce anti-sens BL18SR2PP 5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3'. Dans le cadre de notre étude, la PCR en temps réel a été réalisée pour tous les extraits d'ADN en utilisant l'appareil Rotor-Gene 6000 system (Corbett Life Science). Pour chaque réaction de PCR, le volume final était de 20 µl et contenait 13 µl

## RESULTATS

---

d'eau déminéralisée, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> à une concentration de 25 mM, 1 µl de chacune des deux amorces, 2 µl du réactif du kit DNA Master SYBR Green LC-FastStart (Roche Diagnostics, France) et 1 µl d'ADN de l'échantillon. Pour chaque série d'échantillons, des témoins ont été réalisés afin de valider la PCR : un témoin négatif d'extraction, un témoin négatif de PCR (sans ADN) et un témoin positif (ADN de *Blastocystis* sp. ST4 purifié). Après une activation initiale de l'enzyme et une dénaturation de l'ADN pendant 5 min à 95°C, le cycle de PCR a été répété 45 fois dans les conditions d'amplifications suivantes : dénaturation de l'ADN 5 s à 95°C ; hybridation des amorces 10 s à 68°C ; élongation 15 s à 72°C. Les produits de PCR en temps réel positifs pour *Blastocystis* sp. présentaient une courbe de fusion comprise entre 78°C et 85°C et une valeur de fluorescence  $df/dt > 2$ . Ces deux paramètres étaient nécessaires pour s'assurer de la positivité de la réaction. En effet, la présence d'un signal apparaissant en dehors de la zone de température attendue (78°C-85°C) indiquait une amplification d'ADN non spécifique et de ce fait ces échantillons étaient automatiquement exclus et non séquencés. Pour les échantillons positifs par examen microscopique mais négatifs par PCR, un test de recherche d'inhibiteurs de PCR a été réalisé. Dans ce cas, un contrôle positif a été mélangé avec chaque échantillon d'ADN avec un rapport de 1:4 puis testé de nouveau par PCR. Si un échantillon montrait une valeur de Ct supérieure à celle du contrôle positif seul, il était alors répété en PCR après dilution de l'ADN correspondant au 1/10ème.

### Séquençage des produits de PCR en temps réel et sous-typage des isolats

Les produits de PCR en temps réel positifs ont été envoyés par courrier express au Royaume-Uni à la société Beckman Coulter Genomics pour leur séquençage direct à l'aide des amorces ayant servies à l'amplification. Les séquences obtenues nous arrivent par courrier électronique sous forme d'électrophorégrammes avant d'être lues et éventuellement alignées sur des séquences de référence de *Blastocystis* sp. sp. à l'aide du logiciel BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/>). Ces séquences ont été ensuite comparées à l'aide du programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) à celles d'isolats de *Blastocystis* sp. disponibles dans la base de données GenBank (hébergée sur le site du NCBI ci-dessus) et de STs connus. Cette comparaison nous a permis de déterminer le ST des isolats positifs. Cette recherche est réalisée par BLAST avec les options « others » pour database et « somewhat similar sequences (blastn) » pour la sélection du programme.

### Analyse statistique

## RESULTATS

---

Pour explorer l'association entre facteurs de risque et parasitoses intestinales et en particulier l'infection à *Blastocystis* sp., des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team 2005) en utilisant le test exact de chi-deux et celui de Fisher. La valeur  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.

### I.2.3. Résultats

Dans cette étude, 163 patients ont été inclus dont 77 hommes (47%) et 86 femmes (53%) âgés de 1 à 88 ans avec un âge moyen de 22 ans. Plusieurs caractéristiques et variables socio-économiques et cliniques des patients de cette cohorte sont présentées dans le **Tableau 3**. Ces patients présentaient tous des diarrhées plus ou moins sévères auxquelles pouvaient être associées d'autres troubles digestifs comme des douleurs abdominales et des vomissements. D'après l'examen microscopique direct des selles à l'état frais suivi éventuellement d'une coloration de Ziel-Nielsen modifié, 44,8% des patients (73/163) étaient infectés par au moins un parasite intestinal ce qui confirme la forte prévalence de ces parasitoses au Liban. La quasi-totalité de ces infections étaient causées par des protozoaires puisqu'une seule infection par le *Taenia* a été rapportée. Toujours d'après ces observations microscopiques, *Blastocystis* sp. était le parasite intestinal le plus fréquent (32/163 soit 20,1%) suivi par *E. histolytica* / *E. dispar* (23/163 soit 13,07%). Ces patients pouvaient aussi être infectés par *E. coli*, *E. hartmanni*, *Cryptosporidium* sp., *Giardia intestinalis* et *Trichomonas* avec des prévalences respectives de 10,42% (17/163), 2,45% (4/163), 6,1% (10/163), 3,68% (6/163) et 0,61% (1/163). Cependant, aucun individu infecté par *Blastocystis* sp. n'était aussi infecté par *Cryptosporidium* sp. ou *Trichomonas* (**Tableau 4**).

En utilisant la PCR en temps réel comme méthode d'identification, la prévalence de *Blastocystis* sp. dans cette même population de patients diarrhéiques atteignait 62,6% (102/163). Les échantillons positifs avaient des courbes de fusion comprises entre 78°C à 85°C et montraient des valeurs de Ct différentes reflétant logiquement la présence d'une quantité initiale variable d'ADN et donc de parasites. Comme indiqué ci-dessus, seul 20,1% des patients avaient été diagnostiqués positifs pour *Blastocystis* sp. par examen microscopique direct des selles en comparaison des 62,6% identifiés par PCR en temps réel. De plus, six échantillons positifs pour ce parasite par examen microscopique des selles n'ont pas pu être amplifiés par PCR en temps réel. Cette absence d'amplification n'étant pas, comme nous avons pu le vérifier, liée à la présence d'inhibiteurs dans les selles, elle pourrait donc s'expliquer par une dégradation improbable et involontaire de l'ADN de ces échantillons pour

## RESULTATS

---

des raisons qui restent encore à déterminer ou plutôt par une erreur de notre part dans l'identification du parasite par microscopie.

La positivité des échantillons par PCR en temps réel a été confirmée par séquençage des produits d'amplification. Sur les 102 échantillons positifs par PCR en temps réel, 81 d'entre eux soit 79,4% correspondaient à des mono-infections (**Tableau 4**). Les séquences des produits d'amplification de ces 81 échantillons montraient une très grande similarité (97% à 100%) avec les séquences d'isolats de STs connus disponibles dans les bases de données. Ainsi comme représenté sur la **Figure 24**, le ST3 était prédominant parmi les isolats identifiés (51/81 soit 63%) suivi du ST2 (17/81 soit 21%), du ST1 (11/81 soit 13,6%) et du ST4 (2/81 soit 2,4%). Les électrophorégrammes de séquence des 21 échantillons restant (soit 20,6%) montraient la superposition de deux séquences (ou séquences doubles). D'après notre expérience, ces superpositions témoignent de co-infections par au moins 2 STs de *Blastocystis* sp. probablement issus de sources d'infection différentes. Même si les STs impliqués dans ces co-infections ne pouvaient pas être déterminés par cette approche moléculaire, les échantillons correspondant ont été validés comme étant positifs pour *Blastocystis* sp.

En se basant sur les données cliniques des patients, les analyses statistiques réalisées ont permis de mettre en évidence différents facteurs de risque d'infection par *Blastocystis* sp. (**Tableau 5**). Une association significative a ainsi été observée entre la présence de douleurs abdominales et l'infection par le parasite. De plus, la prévalence de *Blastocystis* sp. était curieusement significativement plus élevée chez les patients vivant dans une zone urbanisée que chez ceux habitant une région rurale. Enfin, les personnes ayant une activité professionnelle en particulier dans l'armée ou avec statut d'employé ou d'étudiant présentaient plus de risque d'être infectés que les personnes sans activité professionnelle. Par contre, l'âge, le sexe, des voyages récents, la qualité de l'eau consommée ou le contact avec des animaux n'étaient pas des facteurs de risque d'infection dans cette population.

### I.2.4. Conclusions

A notre connaissance, cette étude est la seconde menée au Liban concernant l'épidémiologie moléculaire de *Blastocystis* sp. et faisait logiquement suite à celle réalisée précédemment dans la population totale (**Par. I.1.**). C'est par contre la première concernant une cohorte bien ciblée en l'occurrence ici des patients diarrhéiques. Dans cette étude, en recherchant le parasite par deux méthodes distinctes, nous confirmons la faible sensibilité des techniques de diagnostic conventionnelles par microscopie. En effet, la prévalence observée

## RESULTATS

---

dans cette population de patients diarrhéiques est de 20,1% par observation microscopique et de 62,6% par PCR en temps réel soit une augmentation de l'ordre d'un facteur 3. Parmi les 102 patients positifs pour ce parasite par PCR en temps réel, 81 sont infectés par un seul ST de *Blastocystis* sp. et les 4 mêmes STs identifiés dans notre première étude réalisée dans la même région du Nord-Liban sont trouvés chez ces patients. Cependant, les fréquences des différents STs montrent des variations entre les deux populations puisque celle du ST3 est nettement plus importante dans la population de patients diarrhéiques (63%) que dans la population totale (34%). Le ST4 montre dans les deux populations une fréquence faible confirmant ainsi sa quasi-absence dans cette région géographique. D'autre part, les ST1 et ST2 sont plus fréquents dans la population totale que dans la population de patients diarrhéiques. D'ailleurs, la prédominance du ST1 chez les patients symptomatiques mise en évidence dans la première étude n'est pas confirmée dans la seconde enquête puisque le ST3 est largement prédominant dans la cohorte de patients diarrhéiques. Ces données montrent clairement la difficulté à faire ressortir une quelconque corrélation entre certains STs et un pouvoir pathogène. Une analyse statistique nous permet enfin de montrer qu'une activité professionnelle et une vie en région urbaine sont des facteurs de risque d'infection à *Blastocystis* sp. dans cette population de patients diarrhéiques.

Caractéristiques	Fréquence (%)
<b>Sexe :</b>	
Male	77 (47.2%)
Femelle	86 (52.8%)
<b>Groupes d'âge (ans) :</b>	
<22	96 (58.9%)
≥22	67 (41.1%)
<b>Variables socio-économiques :</b>	
Patients au chômage	99 (60.7%)
Environnement urbain	114 (69.9%)
Voyage récent (mois d'un an)	2 (1.2%)
Eau consommée filtrée	47 (28.8%)
Contact avec les animaux	5 (3%)
<b>Symptômes digestifs :</b>	
Diarrhée	163 (100%)
Douleurs abdominales	125 (76.6%)
Vomissement	34 (20.8%)
Fièvre	45 (27.6%)

**Tableau 3 :** Caractéristiques générales de notre cohorte composée de 163 patients Libanais diarrhéiques.

**Tableau 4 :** Age, sexe, symptômes, parasitoses associées et distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez des patients diarrhéiques au Liban. Ne sont indiqués dans ce tableau que les patients positifs pour *Blastocystis* sp. par PCR en temps réel et présentant une mono-infection.

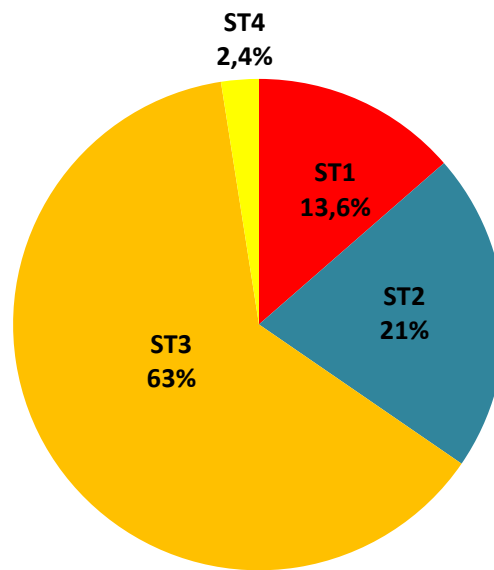
<b>Patients</b>	<b>Age/sexe</b>	<b>Symptômes</b>	<b>Parasites associés</b>	<b>ST de <i>Blastocystis</i> sp.</b>
<b>DDS1</b>	76/F	Diarrhée	-	<b>ST1</b>
<b>DDS2</b>	10/M	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
<b>DDS3</b>	62/M	Diarrhée	-	<b>ST4</b>
<b>DDS4</b>	38/F	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
		Vomissement	-	
<b>DDS5</b>	7/M	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales	-	
<b>DDS6</b>	75/F	Fièvre	-	<b>ST3</b>
		Diarrhée	-	
<b>DDS7</b>	88/F	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
		Fièvre	-	
<b>DDS8</b>	13/M	Vomissement	-	<b>ST3</b>
		Diarrhée	-	
<b>DDS9</b>	74/M	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
<b>DDS10</b>	5/F	Vomissement	-	<b>ST3</b>
		Diarrhée	-	
<b>DDS11</b>	30/M	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
		Fièvre	-	
<b>DDS12</b>	22/M	Diarrhée	-	<b>ST1</b>
<b>DDS13</b>	15/M	Douleurs abdominales	-	<b>ST1</b>
		Fièvre	-	
<b>DDS14</b>	76/F	Diarrhée	-	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales	-	
<b>DDS15</b>	87/F	Vomissement	-	<b>ST2</b>
		Diarrhée	-	
<b>DDS16</b>	43/M	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
<b>DDS17</b>	1/F	Diarrhée	-	<b>ST1</b>
		Douleurs abdominales	-	
<b>DDS18</b>	2/F	Fièvre	-	<b>ST2</b>
		Diarrhée	-	



<b>DDS19</b>	1/F	Douleurs abdominales Diarrhée	-	<b>ST2</b>
<b>DDS20</b>	8/M	Douleurs abdominales Diarrhée	<i>E. coli</i>	<b>ST3</b>
<b>DDS21</b>	62/M	Douleurs abdominales Vomissement Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS22</b>	1/F	Douleurs abdominales Diarrhée Vomissement	<i>E. coli</i>	<b>ST1</b>
<b>DDS23</b>	7/M	Fièvre Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS24</b>	76/F	Douleurs abdominales Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS25</b>	1/F	Douleurs abdominales Fièvre Diarrhée	-	<b>ST2</b>
<b>DDS26</b>	15/M	Douleurs abdominales Diarrhée	<i>E. coli</i>	<b>ST3</b>
<b>DDS27</b>	24/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS28</b>	4/F	Douleurs abdominales Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS29</b>	1/M	Douleurs abdominales Diarrhée	-	<b>ST2</b>
<b>DDS30</b>	67/F	Douleurs abdominales Diarrhée	-	<b>ST1</b>
<b>DDS31</b>	5/M	Douleurs abdominales Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
<b>DDS32</b>	2/M	Fièvre Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS33</b>	1/M	Diarrhée	-	<b>ST1</b>
<b>DDS34</b>	13/F	Douleurs abdominales Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS35</b>	12/M	Fièvre Diarrhée Vomissement	-	<b>ST3</b>
<b>DDS36</b>	4/F	Fièvre Diarrhée	<i>Giardia intestinalis</i>	<b>ST3</b>
<b>DDS37</b>	34/M	Douleurs abdominales Vomissement Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS38</b>	19/M	Douleurs abdominales Vomissement Diarrhée	-	<b>ST2</b>
<b>DDS39</b>	2/F	Vomissement Fièvre Diarrhée	<i>G. intestinalis</i>	<b>ST3</b>
<b>DDS40</b>	34/F	Douleurs abdominales Vomissement Fièvre	-	<b>ST3</b>
<b>DDS41</b>	22/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		

		Vomissement		
<b>DDS42</b>	45/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS43</b>	29/F	Diarrhée	-	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS44</b>	23/M	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS45</b>	46/M	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS46</b>	27/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS47</b>	30/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
		Fièvre		
<b>DDS48</b>	2/M	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
		Fièvre		
<b>DDS49</b>	43/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS50</b>	1/M	Diarrhée	-	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS51</b>	1/M	Diarrhée	-	<b>ST1</b>
		Douleurs abdominales		
		Fièvre		
<b>DDS52</b>	22/F	Diarrhée	-	<b>ST2</b>
<b>DDS53</b>	1/M	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS54</b>	1/M	Diarrhée	<i>E. coli</i>	<b>ST3</b>
		Vomissement		
		Fièvre		
<b>DDS55</b>	5/M	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
		Fièvre		
<b>DDS56</b>	44/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS57</b>	1/F	Diarrhée	<i>E. hartmanii</i>	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS58</b>	28/F	Diarrhée	<i>E. coli</i>	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS59</b>	4/F	Diarrhée	-	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales		
		Vomissement		
<b>DDS60</b>	35/F	Diarrhée	-	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS61</b>	19/M	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS62</b>	28/F	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS63</b>	68/F	Diarrhée	<i>E. coli</i>	<b>ST3</b>
<b>DDS64</b>	25/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS65</b>	51/M	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS66</b>	75/M	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		

<b>DDS67</b>	22/M	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS68</b>	6/F	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST1</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS69</b>	14/M	Diarrhée	-	<b>ST1</b>
		Douleurs abdominales		
		Vomissement		
<b>DDS70</b>	23/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
		Vomissement		
<b>DDS71</b>	6/M	Diarrhée	-	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS72</b>	2/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>DDS73</b>	24/F	Diarrhée	-	<b>ST1</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS74</b>	58/F	Diarrhée	-	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS75</b>	24/F	Diarrhée	<i>E. coli</i>	<b>ST2</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS76</b>	13/F	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
		Vomissement		
<b>DDS77</b>	3/F	Diarrhée	-	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS78</b>	27/F	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
		Douleurs abdominales		
<b>DDS79</b>	25/F	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
		Vomissement		
<b>DDS80</b>	54/F	Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST4</b>
		Douleurs abdominales		
		Fièvre		
<b>DDS81</b>	1/M	Diarrhée	-	<b>ST3</b>



**Figure 24:** Distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez les patients positifs pour le parasite dans la cohorte de patients Libanais diarrhéiques.

Variables	Nombre total de patients	Infection à <i>Blastocystis</i> sp.		OR (95% IC)	p value
		Nombre de patients infectés	%		
<b>Sexe</b>					
Male	77	44	57.1	0.64	0.19
Femelle	86	58	67.4	(0.32-1.27)	
<b>Groupes d'âge</b>					
<22	96	55	57.2	1.87	0.13
≥22	67	47	70.1	(0.86-3.6)	
<b>Activité professionnelles</b>					
Non	99	53	53.5	2.81	0.005*
Oui	64	49	<b>76.5</b>	(1.34-6.15)	
<b>Environnement</b>					
Rural	49	14	28.5	8.32	6.723e-09*
Urbain	114	88	<b>77.1</b>	(3.72-19.5)	
<b>Voyage récent</b>					
Non	161	102	63.3	0	0.13
Oui	2	0	0	(0-3.1)	
<b>Contact avec des animaux</b>					
Non	158	101	63.9	0.14	0.06
Oui	5	1	0	(0.02-1.48)	
<b>Type d'eau consommée</b>					
Non filtrée/non bouillie	116	72	62	1	0.9
Filtrée	47	30	63.8	(0.5-2.3)	
<b>Douleurs abdominales</b>					
Non	38	17	44	2.6	0.01623*
Oui	125	85	<b>68</b>	(1.16- 5.9)	
<b>Vomissements</b>					
Non	129	80	62	1.12	0.9
Oui	34	22	64.7	(0.48-2.7)	
<b>Fièvre</b>					
Non	118	78	66.1	0.14	0.18
Oui	45	24	53.3	(0.27-1.25)	

**Tableau 5 :** Analyse des facteurs de risque d'infection par *Blastocystis* sp. dans la population de 163 patients Libanais diarrhéiques.

### I.3. Analyse d'une population d'écoliers au Liban

**Préambule :** Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de rédaction pour soumission au journal « PLoS One ».

#### I.3.1. Introduction

Dans nos études précédentes menées au Liban (**Par. I.1. et Par. I.2.**), nous nous sommes intéressés à la prévalence et à la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population totale puis dans une cohorte plus ciblée de patients diarrhéiques. Nous avons poursuivi notre enquête épidémiologique dans ce pays en nous focalisant sur une cohorte d'écoliers de la même région de Tripoli. En effet, la littérature est assez contradictoire concernant l'influence de l'âge comme facteur de risque d'infection par le parasite. Par la présente étude, nous amenons notre contribution à cette problématique.

#### I.3.2. Matériels et méthodes

##### Population étudiée et questionnaire

Cette nouvelle étude menée à Tripoli, englobait un total de 249 enfants âgés de 3 à 16 ans et fréquentant deux écoles de Tripoli (Al Zahra' et Jil alwa'ed). Les échantillons de selles ont été recueillis en Décembre 2012 et Janvier 2013. Les parents et/ou les tuteurs légaux des enfants ont signé un formulaire de consentement éclairé concernant la participation de leurs enfants à cette étude. Une brève explication des objectifs de cette étude a été présentée aux enfants et à leurs parents/tuteurs. Un questionnaire standard résumant certaines informations d'intérêt dans cette étude a été complété pour chaque patient (voir **Annexe 1** fiche signalétique vierge).

##### Collecte des échantillons et analyse microscopique des selles

Les 249 échantillons de selles ont été recueillis dans des récipients stériles. Un examen microscopique direct à l'état frais des échantillons de selles a été réalisé comme décrit précédemment (**Par. I.2.2.**) au Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses applications de Tripoli afin d'identifier plusieurs parasites intestinaux. Aucune information n'était disponible pour ces patients concernant la présence d'infections virales ou bactériennes.

## RESULTATS

---

### Extraction d'ADN, sous-typage des isolats et analyse statistique

L'extraction d'ADN total à partir de ces selles (au Liban) et le sous-typage des isolats par PCR en temps réel (en France) ont été réalisés comme décrit précédemment (**Par. I.2.2.**). Il en est de même pour les analyses statistiques visant à déterminer les facteurs de risque d'infection à *Blastocystis* sp.

### **I.3.3. Résultats**

Dans cette étude, les échantillons de selles ont été récoltés chez 249 enfants (149 garçons et 100 filles) âgés de 3 à 16 ans (moyenne d'âge :  $9,3 \pm 3,1$  ans). Certaines caractéristiques et variables socio-économiques et cliniques de cette population sont présentées dans le **Tableau 6**. Les participants à cette étude fréquentaient deux écoles de Tripoli de niveaux socio-économiques différents. Ainsi, une partie des enfants ayant un niveau socio-économique considéré comme élevé fréquentaient l'école Jil Alwa'ed (36,9%) alors que les enfants ayant un niveau socio-économique plus bas étaient scolarisés dans l'école Al-Zahra' (63,1%). Globalement, la moitié des enfants de cette cohorte étaient asymptomatiques (49,8%) alors que les autres étaient symptomatiques et présentaient un ou plusieurs troubles gastro-intestinaux (douleurs abdominales, diarrhée, vomissement, constipation). De plus, quel que soit leur niveau socio-économique, les consommations de fruits et légumes crus (78,3%) et d'eau non traitée (76%) étaient courantes chez ces enfants.

Dans un premier temps, un examen microscopique des selles a montré que 153 enfants (61,2%) étaient positifs pour au moins un parasite intestinal (**Tableau 7**). Ainsi, 70,9% des enfants de l'école de bas niveau socio-économique étaient infectés et « seulement » 44,6% des enfants de l'école de haut niveau socio-économique. Globalement, *Blastocystis* sp. était largement prédominant (moyenne de 51,6%) suivi par *Giardia intestinalis* (14,4%), *Entamoeba histolytica/dispar* (5,6%), *Cryptosporidium* spp. (5,6%), *Entamoeba coli* (2,4%), *Ascaris lumbricoides* (0,4%) et *Hymenolepis nana* (0,4%). La majorité des infections parasitaires étaient des mono-infections (70,6%) mais des infections par deux parasites différents ont été mises en évidence chez 42 enfants (27,5%). Ces derniers étaient surtout infectés par *Blastocystis* sp. et *G. intestinalis*. A cela s'ajoutait trois enfants souffrant d'une triple infection parasitaire mettant en jeu *Blastocystis* sp., *G. intestinalis* et *Cryptosporidium* spp. On note de plus que *Blastocystis* sp. était le parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé quelle que soit l'école fréquentée. Sa prévalence était plus faible dans l'école de plus haut niveau socio-économique (41,3%) par rapport à celle observée dans l'école de plus bas

## RESULTATS

---

niveau socio-économique (57,6%). C'était d'ailleurs aussi le cas pour toutes les autres infections parasitaires à l'exception d'*E. coli*.

La recherche de *Blastocystis* sp. a ensuite été réalisée par PCR en temps réel et 157/249 soit 63% des écoliers étaient positifs pour le parasite. Comme on pouvait s'y attendre aux vues des résultats obtenus dans notre précédente étude (**Par. I.2.**), cette prévalence était donc de nouveau supérieure à celle observée par la méthode microscopique classique. Ainsi la prévalence du parasite passait à 66,2% dans l'école de plus bas niveau socio-économique et à 57,6% dans l'école de plus haut niveau socio-économique. A partir de ces données, des associations ont été recherchées entre certains facteurs démographiques et socio-économiques et l'infection à *Blastocystis* sp. (**Tableau 8**). Les résultats montraient que les enfants âgés de 9 ou plus étaient significativement plus infectés que ceux âgés moins de 9 ans (54% vs 69% ;  $p=0.02$ ). De même, une association significative a été trouvée chez les enfants ayant un membre de leur famille souffrant de symptômes digestifs (72.7% vs 58.7% ;  $p=0.04$ ). De plus, le contact direct avec des animaux (36% vs 65% ;  $p=0.02$ ) et le fait de manger en dehors de la maison (50% vs 66.8% ;  $p=0.03$ ) seraient au contraire des facteurs protecteurs de l'infection. D'autre part, aucune corrélation significative entre l'infection à *Blastocystis* sp. et le sexe de l'enfant, le statut socio-économique, la nature de l'eau consommée ou la consommation de fruits et légumes crus n'a été identifiée. En outre, bien que ce lien soit non significatif, les patients porteurs de *Blastocystis* sp. présentaient plutôt des selles molles. Parmi les différents symptômes digestifs observés, l'infection à *Blastocystis* sp. était significativement plus importante chez les patients ayant des douleurs abdominales (71% vs 56,2% ;  $p=0.02$ ) mais pas chez ceux présentant des diarrhées, une constipation ou des vomissements.

La positivité des échantillons par PCR en temps réel a été confirmée par séquençage des produits d'amplification. Sur les 157 échantillons positifs par PCR en temps réel, 138 d'entre eux soit 87,9% correspondaient à des mono-infections (**Tableau 9**). Les séquences des produits d'amplification de ces 81 échantillons montraient une très grande similarité (97% à 100%) avec les séquences d'isolats de STs connus disponibles dans les bases de données. Ainsi comme représenté sur la **Figure 25**, le ST3 était prédominant parmi les isolats identifiés (64/138 soit 47%) suivi du ST2 (39/138 soit 28%) et du ST1 (35/138 soit 25%). Les électrophorégrammes de séquence des 19 échantillons restant (soit 12,1%) correspondaient à des séquences doubles et donc à des co-infections par au moins 2 STs de *Blastocystis* sp.

Enfin, des analyses statistiques supplémentaires ont été réalisées afin d'étudier la corrélation entre la distribution des STs de *Blastocystis* sp. et les différents facteurs qui montraient précédemment une corrélation significative avec l'infection par le parasite. Ainsi



## RESULTATS

---

les infections mixtes étaient significativement plus fréquentes chez les enfants symptomatiques que chez les asymptomatiques en excluant dans cette analyse tous les patients ayant d'autres parasites intestinaux pouvant être à l'origine de ces troubles (Test de Chi-deux :  $X^2 = 12.5933$  ;  $p\text{-value} = 0.004707$ ) (**Figure 26**). Pour les autres facteurs comme l'âge, les douleurs abdominales ou la présence de troubles digestifs chez un membre de la famille, aucune corrélation avec un ST particulier n'a pu être mise en évidence ( $p > 0.05$ ).

### I.3.4. Conclusions

A notre connaissance, cette étude est la première menée au Liban concernant l'épidémiologie moléculaire de *Blastocystis* sp. chez les enfants et faisait logiquement suite à celles réalisées précédemment dans la population totale (**Par. I.1.**) puis dans une cohorte de patients diarrhéiques (**Par. I.2.**). D'après nos données de microscopie, plus de 60% des enfants testés sont porteurs d'au moins un parasite intestinal ce qui de nouveau montre à quel point ces parasitoses peuvent avoir un impact majeur dans la population libanaise.

Dans cette étude comme dans celle focalisée sur les patients diarrhéiques, nous reconfirmons la faible sensibilité des techniques de diagnostic conventionnelles par microscopie de *Blastocystis* sp. Ainsi, parmi les 249 écoliers testés, 157 d'entre eux sont positifs pour *Blastocystis* sp. par PCR en temps réel soit 63% ce qui est proche de la prévalence observée parmi les patients diarrhéiques (**Par. I.2.**). Dans cette cohorte d'écoliers, les 3 principaux STs décrits dans les deux études précédentes sont retrouvés en l'occurrence et par ordre d'importance les ST3, ST2 et ST1. Le ST4 est absent dans cette population confirmant ainsi de nouveau sa quasi-absence au Liban. A partir de ces données, plusieurs facteurs de risque d'infection par *Blastocystis* sp. sont mis en évidence comme l'âge de l'enfant ( $> 9$  ans) ou la présence d'un membre de sa famille qui souffre de troubles digestifs. De même, l'infection par le parasite est significativement plus importante chez les enfants ayant des douleurs abdominales. Par contre, ces associations ne sont pas en corrélation avec un ST précis de *Blastocystis* sp.

<b>Variables analysées</b>	<b>Fréquence (%)</b>
<b>Sexe</b>	
Male	149 (59.8%)
Femelle	100 (40.2%)
<b>Groupes d'âge</b>	
<9 ans	100 (40.2%)
≥9 ans	149 (59.8%)
<b>Données socio-économiques et cliniques</b>	
Haut niveau économique de l'école fréquentée	92 (36.9%)
Eau consommée traitée	60 (24%)
Contact avec des animaux	19 (7.6%)
Voyage récent (moins d'un an)	6 (2.4%)
Consommation de fruits/légumes crus	195 (78.3%)
Repas en dehors de la maison	56 (22.4%)
Présence de troubles digestifs chez les parents	77 (30.9%)
Présence de selles diarrhéiques chez les enfants	41 (16.4%)
Présence de symptômes gastro-intestinaux chez les enfants	125 (50.2%)

**Tableau 6 :** Caractéristiques générales de notre cohorte composée de 249 écoliers Libanais.

Parasites	249 enfants		Enfants de bas niveau socio-économique		Enfants de haut niveau socio-économique	
	Nombre d'enfants infectés	%	Nombre d'enfants infectés	%	Nombre d'enfants infectés	%
Présence d'une infection	153	61.2%	112	70.9%	41	44.6%
<i>Blastocystis</i> sp.	129	51.6%	91	<b>57.6 %</b>	38	<b>41.3%</b>
<i>Giardia intestinalis</i>	36	14.4%	36	22.8%	0	0%
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	14	5.6%	13	8.2%	1	1.1%
<i>Cryptosporidium</i> spp.	14	5.6%	10	6.3%	4	4.4%
<i>Entamoeba coli</i>	6	2.4%	3	1.9%	3	3.3%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	0.4%	1	0.6%	0	0%
<i>Hymenolepis nana</i>	1	0.4%	1	0.6%	0	0%

**Tableau 7 :** Prévalence des infections parasitaires intestinales chez 249 écoliers Libanais.

Variables analysées	Nombre total de patients	Infection à <i>Blastocystis</i> sp.		OR (95% IC)	p value
		Nombre de patients infectés	%		
<b>Sexe</b>					
Male	149	99	66.4	0.6	0.22
Femelle	100	58	58	(0.4-1.2)	
<b>Groupes d'âge</b>					
<9	100	54	54	1.9	0.02*
≥9	149	103	<b>69.1</b>	(1.09-3.3)	
<b>Statut socio-économique</b>					
Bas niveau	157	104	66.2	0.69	0.22
Haut niveau	92	53	57.6	(0.39-1.2)	
<b>Nature de l'eau consommée</b>					
Traitée	60	35	64.5	0.76	0.47
Non traitée	189	122	58.3	(0.4-1.46)	
<b>Contact avec des animaux</b>					
Non	230	150	<b>65.2</b>	0.31	0.02*
Oui	19	7	36.8	(0.1-0.9)	
<b>Voyage récent</b>					
Non	243	153	62.9	1.17	1
Oui	6	4	66.6	(0.16-13.2)	
<b>Consommation de fruits/légumes crus</b>					
Non	54	31	57.4	1.35	0.41
Oui	195	126	64.6	(0.69-2.61)	
<b>Repas en dehors de la maison</b>					
Non	193	129	<b>66.8</b>	0.49	0.03*
Oui	56	28	50	(0.25-0.95)	
<b>Troubles digestifs chez les parents</b>					
Non	172	101	58.7	1.8	0.04*
Oui	77	56	<b>72.7</b>	(1-3.5)	
<b>Formes des selles</b>					
Solide	46	27	58.6	-	0.5
Molle	162	106	65.4		
Diarrhée	41	24	58.5		
<b>Symptômes gastro-intestinaux</b>					
Non	124	71	57.2	1.64	0.07
Oui	125	86	68.8	(0.9-2.8)	
<b>Douleurs abdominales</b>					
Non	135	76	56.2	1.9	0.02*
Oui	114	81	<b>71</b>	(1-3.3)	
<b>Diarrhée</b>					
Non	186	112	60.2	1.64	0.14
Oui	63	45	71.4	(0.85-3.2)	
<b>Vomissement</b>					
Non	222	140	63	0.99	1
Oui	27	17	62.9	(0.4-2.5)	

<b>Constipation</b>						
Non	243	154	63.3%	0.5	(0.07-4.4)	0.6
Oui	6	3	50			
<b>Fièvre</b>						
Non	236	151	63.9	0.4	(0.12-1.74)	0.3
Oui	13	6	46.1			

**Tableau 8 :** Résultats des analyses statistiques visant à identifier les facteurs de risque d'infection par *Blastocystis* sp. dans la cohorte de 249 écoliers Libanais.

**Tableau 9 :** Age, sexe, symptômes, parasitoses associées et distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez les écoliers au Liban. Ne sont indiqués dans ce tableau que les patients positifs pour *Blastocystis* sp. par PCR en temps réel et présentant une mono-infection.

Patients	Sexe	Age	Symptômes	Parasites associés	STs de <i>Blastocystis</i> sp. <sup>a</sup>
ZB 1	F	12	-	-	ST1
ZB 2	F	10	Douleurs abdominales Diarrhée Céphalée Asthénie	<i>Entamoeba coli</i>	ST3
ZB 3	F	9	Douleurs abdominales Diarrhée Céphalée Asthénie	-	ST3
ZB 4	F	10	Douleurs abdominales Céphalée Asthénie	<i>Giardia intestinalis</i>	ST1
ZB 5	M	7	-	-	ST1
ZB 6	F	10	-	-	ST3
ZB 7	M	9	-	<i>E. coli</i>	ST2
ZB 8	M	13	Douleurs abdominales Diarrhée Vomissement	<i>Entamoeba histolytica</i>	ST3
ZB 9	F	10	-	-	ST3
ZB 10	M	11	-	-	ST2
ZB 11	F	11	Douleurs abdominales Diarrhée Vomissement Fièvre	-	ST3
ZB 12	F	8	Douleurs abdominales Céphalée	<i>G. intestinalis</i>	ST1
ZB 13	F	7	Douleurs abdominales Céphalée	<i>E. histolytica</i> <i>G. intestinalis</i>	ST2
ZB 14	F	11	Douleurs abdominales Diarrhée	-	ST2
ZB 15	F	11	Douleurs abdominales Douleurs abdominales	-	ST3
ZB 16	F	8	Céphalée Asthénie	<i>G. intestinalis</i>	ST3
ZB 17	F	9	Douleurs abdominales Céphalée	<i>G. intestinalis</i>	ST3
ZB 18	M	10	Douleurs abdominales Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	ST1
ZB 19	F	10	Douleurs abdominales Diarrhée Vomissement	<i>G. intestinalis</i>	ST1
ZB 20	M	11	Douleurs abdominales	-	ST2
ZB 21	M	13	Douleurs abdominales Céphalée	-	ST3

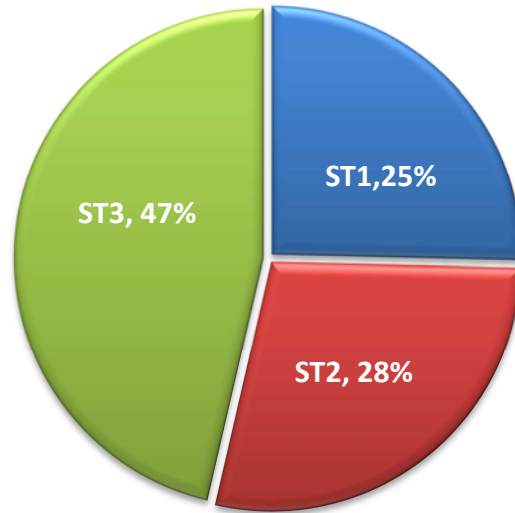
			Asthénie		
			Douleurs abdominales		
<b>ZB 22</b>	M	12	Diarrhée	-	
			Céphalée		
			Vomissement		<b>ST2</b>
<b>ZB 23</b>	M	12	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 24</b>	F	9	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 25</b>	F	10	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 26</b>	M	9	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 27</b>	F	9	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 28</b>	F	11	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	<b>ST1</b>
<b>ZB 29</b>	F	9	-	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
<b>ZB 30</b>	F	8	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 31</b>	F	7	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 32</b>	M	13	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	<b>ST1</b>
<b>ZB 33</b>	F	6	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 34</b>	F	6	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 35</b>	F	8	-	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<b>ST3</b>
			Douleurs abdominales		
<b>ZB 36</b>	M	9	Diarrhée	<i>G. intestinalis</i>	
			Fièvre		<b>ST3</b>
<b>ZB 37</b>	M	7	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 38</b>	M	8	Douleurs abdominales	<i>Cryptosporidium</i>	<b>ST1</b>
<b>ZB 39</b>	M	5	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Céphalée		<b>ST3</b>
<b>ZB 40</b>	M	9	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Céphalée	<i>Cryptosporidium</i>	<b>ST3</b>
<b>ZB 41</b>	M	11	Douleurs abdominales	-	<b>ST2</b>
			Douleurs abdominales		
<b>ZB 42</b>	M	6	Diarrhée	<i>G. intestinalis</i>	
			Vomissement	<i>Cryptosporidium</i>	<b>ST2</b>
<b>ZB 43</b>	M	10	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 44</b>	M	9	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 45</b>	M	10	-	<i>E. histolytica</i>	<b>ST3</b>
<b>ZB 46</b>	M	9	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Diarrhée		<b>ST3</b>
<b>ZB 47</b>	M	9	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 48</b>	M	11	-	<i>Hymenolepis nana</i>	<b>ST3</b>
<b>ZB 49</b>	F	12	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
			Douleurs abdominales		
<b>ZB 50</b>	M	13	Vomissement	<i>E. histolytica</i>	
			Céphalée		<b>ST3</b>
<b>ZB 51</b>	M	10	Douleurs abdominales	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 52</b>	M	6	Douleurs abdominales	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 53</b>	M	10	Douleurs abdominales	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 54</b>	M	9	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 55</b>	M	7	-	<i>G. intestinalis</i>	<b>ST3</b>
<b>ZB 56</b>	M	7	Douleurs abdominales	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 57</b>	M	11	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 58</b>	M	9	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 59</b>	M	11	-	-	<b>ST3</b>

			Douleurs abdominales		
<b>ZB 60</b>	M	13	Céphalée	<i>G. intestinalis</i>	
			Asthénie		<b>ST3</b>
<b>ZB 61</b>	M	12	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 62</b>	M	14	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 63</b>	M	14	Douleurs abdominales	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 64</b>	M	15	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Diarrhée		<b>ST3</b>
<b>ZB 65</b>	M	12	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Diarrhée		
			Vomissement		<b>ST2</b>
<b>ZB 66</b>	M	13	Douleurs abdominales	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 67</b>	M	13	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	<b>ST2</b>
<b>ZB 68</b>	M	6	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 69</b>	M	5	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 70</b>	M	7	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 71</b>	M	15	Douleurs abdominales		
			Diarrhée	<i>G. intestinalis</i>	
			Vomissement		<b>ST1</b>
<b>ZB 72</b>	M	13	Douleurs abdominales		
			Diarrhée	<i>G. intestinalis</i>	
			Asthénie		
			Vomissement		<b>ST3</b>
<b>ZB 73</b>	F	11	Douleurs abdominales		
			Diarrhée	<i>G. intestinalis</i>	
			Céphalée		
			Asthénie		<b>ST3</b>
<b>ZB 74</b>	F	15	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 75</b>	M	10	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Diarrhée		<b>ST2</b>
<b>ZB 76</b>	M	14	Douleurs abdominales	-	
			Diarrhée		<b>ST1</b>
<b>ZB 77</b>	M	13	Douleurs abdominales	-	
			Diarrhée		<b>ST1</b>
<b>ZB 78</b>	F	14	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 79</b>	M	14	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 80</b>	M	14	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 81</b>	M	15	Douleurs abdominales	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 82</b>	F	11	Diarrhée	-	
			Constipation		<b>ST2</b>
<b>ZB 83</b>	F	9	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 84</b>	F	4	Douleurs abdominales	<i>Cryptosporidium</i>	
			Diarrhée		<b>ST1</b>
<b>ZB 85</b>	M	11	Douleurs abdominales	-	
			Diarrhée		<b>ST2</b>
<b>ZB 86</b>	M	9	Douleurs abdominales	-	
			Diarrhée		<b>ST1</b>
<b>ZB 87</b>	M	6	Diarrhée	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 88</b>	M	3	Douleurs abdominales	-	
			Vomissement		<b>ST1</b>
<b>ZB 89</b>	F	8	-	-	<b>ST2</b>



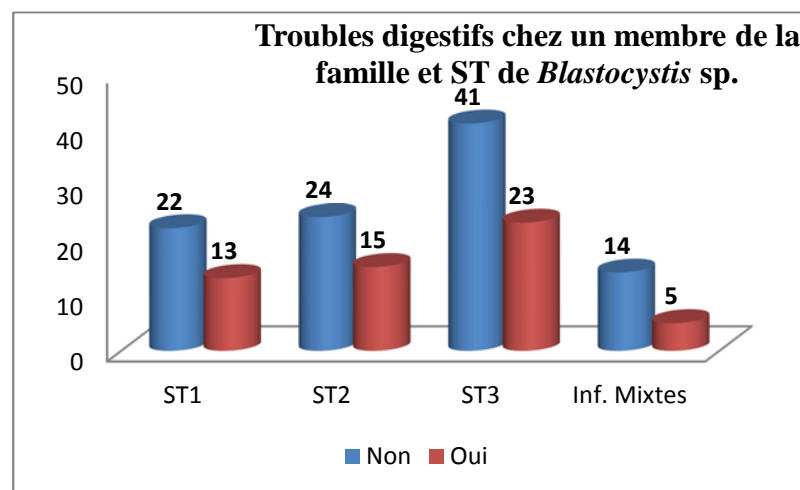
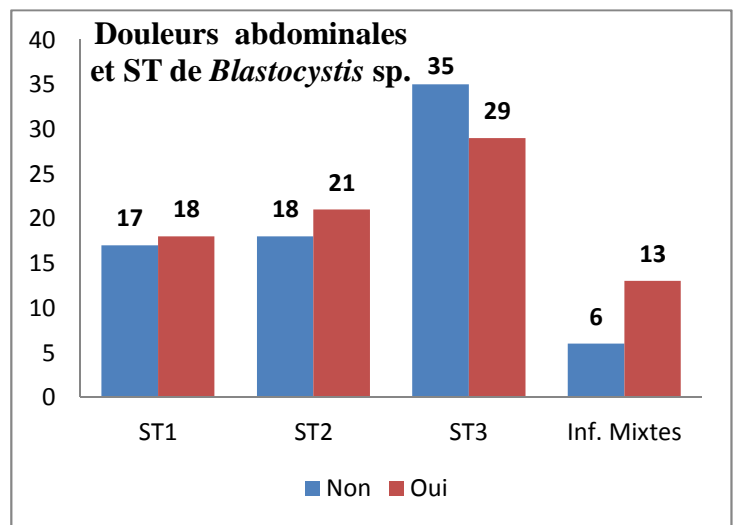
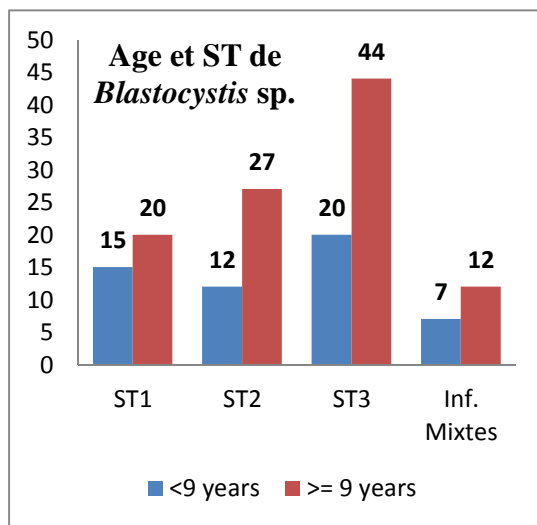
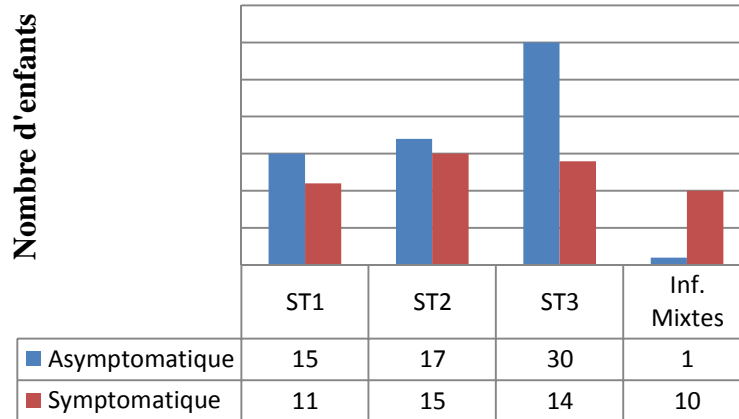
<b>ZB 90</b>	M	5	Douleurs abdominales Céphalée	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 91</b>	M	6	Douleurs abdominales Diarrhée Vomissement	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 92</b>	F	6	Douleurs abdominales	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 93</b>	M	5	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 94</b>	F	7	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 95</b>	M	4	Douleurs abdominales Diarrhée Asthénie Fièvre	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 96</b>	M	6	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 97</b>	M	8	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 98</b>	F	7	Douleurs abdominales Vomissement	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 99</b>	M	12	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 100</b>	M	9	Douleurs abdominales Constipation	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 101</b>	M	6	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 102</b>	F	10	Douleurs abdominales Douleurs articulaires	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 103</b>	M	6	Diarrhée Constipation	<i>E. coli</i>	<b>ST1</b>
<b>ZB 104</b>	F	7	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 105</b>	M	9	Douleurs abdominales Diarrhée Vomissement	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 106</b>	M	7	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 107</b>	F	9	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 108</b>	F	10	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 109</b>	F	8	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 110</b>	F	9	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 111</b>	F	16	Douleurs abdominales Diarrhée	<i>E. histolytica</i>	<b>ST2</b>
<b>ZB 112</b>	M	11	-	<i>E. coli</i>	<b>ST2</b>
<b>ZB 113</b>	F	3	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 114</b>	F	7	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 115</b>	F	6	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 116</b>	M	10	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 117</b>	F	7	Douleurs abdominales Diarrhée	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 118</b>	M	4	Douleurs abdominales Diarrhée	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 119</b>	M	10	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 120</b>	F	5	Douleurs abdominales	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 121</b>	F	14	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 122</b>	M	13	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 123</b>	M	13	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 124</b>	F	6	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 125</b>	F	10	Douleurs abdominales	-	<b>ST3</b>

			Diarrhée		
			Vomissement		
			Fièvre		
<b>ZB 126</b>	F	8	-	-	<b>ST2</b>
<b>ZB 127</b>	M	12	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 128</b>	F	9	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 129</b>	M	4	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 130</b>	M	5	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 131</b>	M	14	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Diarrhée		<b>ST3</b>
<b>ZB 132</b>	M	14	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 133</b>	F	14	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 134</b>	M	15	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Diarrhée		<b>ST3</b>
<b>ZB 135</b>	M	14	-	-	<b>ST1</b>
<b>ZB 136</b>	M	15	-	-	<b>ST3</b>
<b>ZB 137</b>	M	13	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Diarrhée		<b>ST3</b>
<b>ZB 138</b>	M	14	Douleurs abdominales	<i>G. intestinalis</i>	
			Diarrhée		<b>ST2</b>



**Figure 25:** Distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la cohorte d'écoliers Libanais.

### Symptômes digestifs et ST de *Blastocystis* sp.



**Figure 26 :** Résultats d'analyses statistiques visant à corréler le ST de *Blastocystis* sp. à des facteurs de risque d'infection par le parasite dans la population d'écoliers Libanais.

### I.4. Analyse d'une population d'enfants au Sénégal

**Préambule :** Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal BMC Infectious Diseases. Cet article est classé « Highly accessed » par ce journal en fonction du nombre de vues et de téléchargements.

#### I.4.1. Introduction

Depuis quelques d'années, les données portant sur la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. à travers le monde ont commencé à affluer dans la littérature. Pourtant, ces données restent encore très limitées dans quelques zones géographiques comme le continent africain alors qu'il est plus que probable que la situation vis-à-vis de ce parasite est alarmante dans cette région du globe du fait de conditions d'hygiène souvent précaires. Les quelques études d'épidémiologie moléculaire disponibles et prenant souvent en compte un nombre faible d'individus ont été réalisées en Afrique du Nord et de l'Ouest comme en Egypte (Hussein et al. 2008 ; Souppart et al. 2010 ; Fouad et al. 2011), en Lybie (Abdulsalam et al. 2013b ; Alfellani et al. 2013c), au Nigéria et au Libéria (Alfellani et al. 2013c) et en Afrique de l'Est comme en Tanzanie (Petrasova et al. 2011). Ces pays sont souvent caractérisés par des climats et des modes de vie très différents de ceux de la majorité des autres régions étudiées jusqu'à présent ce qui peut influencer la distribution des différents STs de *Blastocystis* sp. dans ces populations comme dans l'environnement. Afin de combler un manque de données concernant la distribution géographique des différents STs de ce parasite, une étude épidémiologique a été menée pour la première fois au Sénégal incluant 93 enfants présentant ou non des troubles gastro-intestinaux et vivant dans 3 villages du district de Podor dans le bassin de la rivière Sénégal. Un questionnaire standardisé a été rempli pour chaque individu inclus dans cette cohorte (**Annexe 2**).

#### I.4.2. Résultats

**El Safadi D**, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, Hamze M, Riveau G, Viscogliosi E (2014) Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide BMC Infectious Diseases, 14:164 (**highly accessed**).

## RESULTATS

---

### I.4.3. Conclusions

En utilisant la PCR en temps réel, la prévalence de *Blastocystis* sp. dans cette cohorte d'enfants Sénégalais est de 100%. C'est bien entendu la plus forte prévalence jamais déterminée pour ce parasite à travers le monde. Par cette approche moléculaire couplée pour quelques échantillons à une PCR classique suivie d'un clonage du produit de PCR, nous avons pu identifier 85 mono-infections et 8 infections mixtes par 2 ou 3 STs (multiples sources d'infections potentielles) selon les échantillons et sous-typer ainsi 103 isolats de *Blastocystis* sp. La distribution des STs dans cette population est la suivante : ST3 (49,5%), ST1 (28,2%), ST2 (20,4%) et ST4 (1,9%). Cette répartition avec en particulier la prédominance du ST3 est similaire à celles observées dans de très nombreux pays et confirme de plus l'absence ou la très faible prévalence du ST4 en Afrique. Ainsi les ST1, ST2 et ST3 représentent à eux trois plus de 80% de tous les isolats sous-typés en Afrique (Alfellani et al. 2013c et cette étude). D'après l'analyse des données cliniques obtenues pour chacun des enfants de cette étude, le ST3 est dominant dans le groupe des individus symptomatiques alors que les ST1 et ST2 présentent des prévalences similaires au sein des individus symptomatiques et asymptomatiques. D'autre part, plus de la moitié des enfants infectés par ce parasite souffrent de divers troubles gastro-intestinaux pouvant être liés à une infection par *Blastocystis* sp. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence dans cette étude de corrélation entre le ST de *Blastocystis* sp. et l'apparition de symptômes gastro-intestinaux car ces enfants sont infectés par de nombreux parasites qui peuvent être aussi responsables de troubles digestifs similaires.

1 **Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever**  
2 **observed worldwide**

3

4 **Dima El Safadi<sup>1,2†</sup>**

5 <sup>†</sup> Dima El Safadi and Lobna Gaayeb contributed equally to this work

6 Email: dima.elsafadi@hotmail.com

7 **Lobna Gaayeb<sup>1,3†</sup>**

8 <sup>†</sup> Dima El Safadi and Lobna Gaayeb contributed equally to this work

9 Email : lobna.gaayeb@gmail.com

10 **Dionigia Meloni<sup>1,4</sup>**

11 Email : dionigia.meloni@riken.jp

12 **Amandine Cian<sup>1</sup>**

13 Email : amandine.cian@gmail.com

14 **Philippe Poirier<sup>5</sup>**

15 Email: ppoirier@chu-clermontferrand.fr

16 **Ivan Wawrzyniak<sup>5</sup>**

17 Email: ivan.wawrzyniak@univ-bpclermont.fr

18 **Frédéric Delbac<sup>5</sup>**

19 Email: frederic.delbac@univ-bpclermont.fr

20 **Fouad Dabboussi<sup>2</sup>**

21 Email : fdaboussi@hotmail.com

22 **Laurence Delhaes<sup>1</sup>**

23 Email : laurence.delhaes@pasteur-lille.fr

24 **Modou Seck<sup>3</sup>**

25 Email : modou.seck@espoir-sante.org

26 **Monzer Hamze<sup>2</sup>**

27 Email : mhamze@monzerhamze.com

28 **Gilles Riveau<sup>1,3</sup>**

29 Email : gilles.riveau@gmail.com

30 **Eric Viscogliosi<sup>1\*</sup>**

31 \*Corresponding author

32 Email : eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

33

34 <sup>1</sup> Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), Inserm U1019,

35 CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Lille, France

36 <sup>2</sup> Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, Laboratoire

37 Microbiologie, Santé et Environnement, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon

38 <sup>3</sup> Biomedical Research Center Espoir pour la Santé (CRB-EPLS), Saint-Louis, Senegal

39 <sup>4</sup> Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN BioResource Center,

40 Tsukuba, Japan

41 <sup>5</sup> Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, CNRS UMR 6023, Université

42 Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, Aubière, France

43

44 \* Correspondence: eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

45 Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), Inserm U1019,

46 CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245,

47 59019 Lille cedex, France

48



## Abstract

**Background:** *Blastocystis* sp. is currently the most common intestinal protist found in human feces and considered an emerging parasite with a worldwide distribution. Because of its potential impact in public health, we reinforced the picture of *Blastocystis* sp. prevalence and molecular subtype distribution in Africa by performing the first survey of this parasite in Senegal.

**Methods:** Stool samples from 93 symptomatic presenting with various gastrointestinal disorders or asymptomatic children living in three villages of the Senegal River Basin were tested for the presence of *Blastocystis* sp. by non-quantitative and quantitative PCR using primer pairs targeting the SSU rDNA gene. Positive samples were subtyped to investigate the frequency of *Blastocystis* sp. subtypes in our cohort and the distribution of subtypes in the symptomatic and asymptomatic groups of children.

**Results:** By the use of molecular tools, all 93 samples were found to be positive for *Blastocystis* sp. indicating a striking parasite prevalence of 100%. Mixed infections by two or three subtypes were identified in eight individuals. Among a total of 103 subtyped isolates, subtype 3 was most abundant (49.5%) followed by subtype 1 (28.2%), subtype 2 (20.4%) and subtype 4 (1.9%). Subtype 3 was dominant in the symptomatic group while subtypes 1 and 2 were detected with equal frequency in both symptomatic and asymptomatic groups. The distribution of subtypes was compared with those available in other African countries and worldwide. Comparison confirmed that subtype 4 is much less frequently detected or absent in Africa while it is commonly found in Europe. Potential sources of *Blastocystis* sp. infection including human-to-human, zoonotic, and waterborne transmissions were also discussed.

**Conclusions:** The prevalence of *Blastocystis* sp. in our Senegalese population was the highest prevalence ever recovered worldwide for this parasite by reaching 100%. All cases were caused by subtypes 1, 2, 3 and 4 with a predominance of subtype 3. More than half of the

children infected by *Blastocystis* sp. presented various gastrointestinal disorders. Such high prevalence of blastocystosis in developing countries makes its control a real challenge for public health authorities.

**Keywords:** *Blastocystis* sp., Intestinal parasite, Molecular epidemiology, Pathogenicity, PCR, Subtyping, Transmission, Zoonosis

## Background

*Blastocystis* sp. is an anaerobic protist that inhabits the gastrointestinal tract of humans and many groups of animals [1-4]. This cosmopolitan enteric parasite with a worldwide distribution [5] is often identified as the most common unicellular eukaryote reported in human fecal samples [1]. Indeed, its prevalence may exceed 50% in developing countries [6,7] and reach 20% in industrialized countries [8,9]. These differences may be explained by poor sanitary conditions, close animal contact, and consumption of contaminated food or water [10-12]. Such prevalence also suggests large-scale human-to-human [13], waterborne, and zoonotic transmissions for *Blastocystis* sp. [14]. Numerous studies have demonstrated the resistance of cysts of the parasite in feces and environmental sources [15] highlighting the fecal-oral route as the main mode of transmission of *Blastocystis* sp. Moreover, a higher risk of infection has been identified in food and animal handlers, providing conclusive evidence on the transmission of the parasite between humans and animals [16,17].

At the morphological level, *Blastocystis* sp. isolates from humans and animals have been reported to be roughly indistinguishable [1]. However, extensive genetic diversity among *Blastocystis* sp. isolates has been reported based on the comparison of the small-subunit (SSU) rDNA gene sequence [18] leading to the classification of *Blastocystis* sp. isolates into subtypes (STs) [19]. To date, according to recent epidemiological surveys in human and animal populations, 17 STs have been identified [2] but it is highly likely that other STs remain yet to be uncovered. Among the 17 STs, nine of them have been detected in humans with a varying prevalence [5]. Indeed, only four of them are frequent (ST1, ST2, ST3 and ST4) and represent around 90% of the subtyped isolates. A majority of human infections with *Blastocystis* sp. is attributable to ST3 but the distribution of the four predominant STs may vary among the areas studied. Thereby, ST4 is almost as common as ST1 and ST3 in some European countries but seems rare or completely absent in Africa, Asia, and America

[5,20]. The other STs that are common in animal hosts i.e. ST5 to ST9, are rarely found in humans and are most likely the result of zoonotic transmission.

As *Blastocystis* sp. can be found in both symptomatic and asymptomatic patients its clinical relevance remained uncertain [1]. However, a converging bundle of recent *in vivo*, *in vitro* and genomic data strongly suggests that this microorganism may be pathogen [21-24] and allows proposing a model for pathogenesis of this parasite [25] particularly involving virulence factors as cysteine proteases [26,27]. Therefore, *Blastocystis* sp. should be associated with a variety of non-specific gastrointestinal disorders including diarrhea, abdominal pain, nausea and vomiting [1,22] and also suspected to be linked to irritable bowel syndrome (IBS) [25,28] and chronic or acute urticarial lesions [29,30]. In addition, *Blastocystis* sp. has increasingly been implicated in diarrheal illness in immunocompromised individuals including HIV/AIDS and cancer patients and transplant recipients [31,32].

It has long been suggested that the pathogenesis of *Blastocystis* sp. may be dependent upon ST but recent epidemiological data remain contradictory [8,29,33-36]. Nevertheless, the likely pathogenic power of *Blastocystis* sp. coupled to its high prevalence in the human population raise crucial questions about its current burden in public health. Consequently, information on the prevalence of the parasite and the distribution of STs are starting to emerge in still poorly studied geographic areas as Africa. To date the available data concern only few African countries of the North and West such as Egypt [21,37,38], Libya, Nigeria, and Liberia [5] and one Eastern African country, Tanzania [39]. Therefore, the aim of the present study was to reinforce the picture of *Blastocystis* sp. prevalence and ST distribution in Africa by performing the first survey of this parasite in Senegal. In this epidemiological study, we described the prevalence of *Blastocystis* sp. infection and ST distribution in a cohort of Senegalese children living in 3 rural villages in close contact with animals and with poor or no access to clean water and sanitation. The distribution of *Blastocystis* sp. STs in both

asymptomatic and symptomatic individuals was investigated together with potential risk factors for transmission of the parasite.

## **Methods**

### **Cohort and collection of samples**

This work has been carried out as part of the “SchistoVAN” project (clinicaltrials.gov ID NCT01553552), sponsored by the Biomedical Research Centre EPLS (Saint-Louis, Senegal) (www.espoir-sante.org). The present study was approved by the National Ethics Committee of the Ministry of Health of Senegal (September 2011; protocol number SEN11/43, clinicaltrials.gov: NCT01553552). Oral and written informed consents were obtained from the parents or the legal guardians of the children in accordance with the Code of Ethics of the World Medical association (Declaration of Helsinki). Children enrolled in the present study formed a sub-cohort of the “AnoPalAnoVac” project (clinicaltrials.gov ID NCT01545115) and were recruited on the basis of their age (6 to 10 years of age in October 2011) through village nurses, healthcare workers in the community and school directors. Date of birth was ascertained from vaccination cards or school register. A standardized questionnaire was completed for each child (see supplementary material). In particular, children were asked about each gastrointestinal symptom individually including abdominal pain, diarrhea, and vomiting. This cross-sectional study was conducted in October 2011, in 3 villages of the Podor district located in northern Senegal: Agniam Towguel (16°32’N-14°48’W; total population (TP): 989; several temporary ponds, traditional housing, irrigated crops), Fanaye Diery (16°32’N-15°13’W; TP: 6781; animal husbandry, irrigated crops, some urbanized habitat), and Niandane (16°35’N-14°59’W; TP: 5100; rice and banana farming, irrigated crops, some urbanized habitat, no access to running water). In this region, the climate is Sahelian, with annual rainfall between July and September. Mean temperature ranges between

20°C and 30°C during the cool season (November to February) and between 25°C and 38°C during the warm season (March to October). In this study, stool samples were collected from 93 symptomatic and asymptomatic children (Agniam = 17; Fanaye = 38; Niandane = 38) presenting or not gastrointestinal disorders. These boys (n = 46) and girls (n = 47) were aged 6 to 10 years (median age 8.4; quartiles: 6.6; 9.5) (Table 1). Children presented no symptoms of severe illness and/or fever and were subject to a questionnaire that was designed to collect clinical data especially regarding recent diarrhea, vomiting, and abdominal pain. For storage and transport at -20°C to Lille, stool samples were added in Stool Transport and Recovery (S.T.A.R.) buffer (Roche) in a ratio of 1:3 according to the manufacturer's recommendations then homogenized by shaking.

#### **DNA extraction and molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates**

Samples stored in S.T.A.R. buffer were stirred and then centrifuged for 1 min at 1,000 g. Total genomic DNA was extracted from 200 µl of the cleared stool supernatant using the QiaAMP DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. For each sample, 5 µl of extracted DNA was submitted to non-quantitative Polymerase Chain Reactions (non-qPCRs) as previously described using two independent pairs of *Blastocystis* sp.-specific primers designed by Scicluna et al. [40] and Poirier et al. [20], both targeting the small subunit (SSU) rDNA coding region. The respective 600 bp- and 320 bp-amplified domains have been shown to contain sufficient information for accurate subtyping of *Blastocystis* sp. isolates [20,40]. Non-qPCR amplifications were carried out in 50 µl according to standard conditions for Platinum *Taq* High-Fidelity DNA polymerase (Invitrogen). For each DNA sample, the non-qPCR product with the highest intensity on agarose gel was purified and sequenced. Direct sequencing of few non-qPCR products generated mixed signals that could reflect infections by different STs or was of poor quality

probably due to a too small amount of parasite DNA matrix. Because of the difficulty in interpreting the corresponding DNA sequencing chromatograms, same samples were re-analyzed by non-qPCRs and positive bands of the expected sizes were purified and cloned as previously described [41]. Three positive clones containing inserts were arbitrarily selected for each sample and sequenced on both strands. The DNA samples negative by non-qPCRs were subsequently amplified using the real time qPCR assay developed by Poirier et al. [20]. Due to the high sensitivity of this detection method, various controls were performed to prevent artifacts related to contamination through different sources: DNA extraction controls (isolation of DNAs without stool and from a *Blastocystis* sp.-negative stool) subsequently used in qPCR assays and negative (DNA matrix replaced by water) and positive (DNA obtained from a *Blastocystis* sp. ST4 culture) qPCR controls. The expected 320 bp-amplified variable region of the SSU rRNA gene was directly sequenced for subtyping. The SSU rRNA gene sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession numbers KF848509 to KF848624. Obtained sequences were compared with all *Blastocystis* sp. SSU rRNA gene sequences available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using the BLAST program. STs were identified by determining the exact match or closest similarity against all known *Blastocystis* sp. STs according to the updated classification by Alfellani et al. [2].

## **Results and discussion**

### **Screening for *Blastocystis* sp. in a cohort of Senegalese children using molecular methods**

In this study, fecal samples were collected from 93 children, 46 boys and 47 girls, aged 6 to 10 years and living in 3 villages situated in the north of Senegal. This cohort consisted of two groups: one symptomatic composed of 54 children presenting variously with abdominal pain, vomiting, and diarrhea and one asymptomatic including 39 other children (Table 1). All 93

205 samples were screened for *Blastocystis* sp. by non-qPCR and qPCR methods using specific  
206 primer pairs amplifying distinct domains of the SSU rDNA coding region [20,40]. Non-qPCR  
207 products were directly sequenced or subsequently cloned whether the resulting sequence  
208 chromatogram showed double or poor quality signals. In the latter case that involved 32  
209 samples, three positive clones containing inserts were arbitrarily selected and sequenced.  
210 Overall, 71 samples were identified as positive for *Blastocystis* sp. by non-qPCR methods.  
211 The remaining 22 samples negative by non-qPCR nevertheless proved to be positive for the  
212 parasite by qPCR. Thereby, by means of these different molecular approaches, *Blastocystis*  
213 sp. was recognized in 100% of stool samples of this Senegalese population. To our knowledge  
214 this represents the highest prevalence ever recovered worldwide for this parasite.

215 In almost all molecular epidemiological studies conducted to date, only one nucleic  
216 acid-based diagnostics methodology was used to identify and subtype *Blastocystis* sp. isolates  
217 in stool samples. Briefly, PCR screening of fecal samples can be achieved using ST-specific  
218 sequence-tagged-site (STS) primers or genus-specific primers with subsequent sequencing for  
219 ST identification. Several regions in the SSU rDNA gene have been proposed by different  
220 authors for sequencing [24] but the “barcode” region designed by Scicluna et al. [40] has been  
221 extensively used as in the present study. Advantages and limitations of these two PCR  
222 approaches were recently largely discussed [24,42] and a comparative study using both  
223 techniques recommended barcoding as the relevant method for *Blastocystis* sp. diagnosis and  
224 subtyping [43]. However, as confirmed from our data, direct sequencing of non-qPCR  
225 products may be unsuccessful in the case of mixed infections with more than one *Blastocystis*  
226 sp. ST in the same sample. Therefore subtyping of isolates in mixed infections requires  
227 cloning of the non-qPCR product and sequencing of several clones as previously suggested  
228 [44]. In addition, about 24% of the samples have not been diagnosed as positive for  
229 *Blastocystis* sp. by non-qPCR methods in our study. Hence, at this stage of our screening, the



prevalence of the parasite was 74%, which greatly underestimated its true prevalence as determined in a second step by qPCR (100%). Consequently, our study confirmed the impact of detection methods to ascertain the actual prevalence of *Blastocystis* sp. in human populations and the interest and higher sensitivity of qPCR assays in comparison to non-qPCR methods for epidemiological surveys.

Although the prevalence of *Blastocystis* sp. never reached 100% in any cohort studied so far, it was described as very high in some developing countries specially, in children. By using non-molecular standard methods, the prevalence of the parasite already exceeded 40% in communities in Venezuela [45], Peru [46], Colombia [7], and in school children or orphanage in Indonesia [6], Thailand [47], and Lebanon (El Safadi unpubl.). Moreover, the prevalence of *Blastocystis* sp. was around 60% in immigrants in the city of Naples (southern Italy) who came for a large majority from northern and western African countries [48]. In Libya, the prevalence of the parasite has been previously reported close to 30% [49]. In Senegal, although the prevalence of *Blastocystis* sp. had never been determined before, intestinal parasites (protozoa and helminths) represent for a long time a major public health problem. Indeed, the global prevalence of intestinal parasites in children ranged from 32% to 84% depending on the study areas [50-53]. Such impact of intestinal parasites previously reported in the Senegalese population is clearly in accordance with the pattern found for *Blastocystis* sp. in the current study.

#### **Distribution of *Blastocystis* sp. STs in the Senegalese population and comparison with other African countries**

In all the children, the expected SSU rDNA domains targeted by non-qPCR and qPCR methods were amplified and successfully sequenced. Each of the new SSU rDNA gene sequences obtained in this study showed very high similarity (98% to 100%) to homologous

255 sequences of the other *Blastocystis* sp. isolates reported so far. The comparison with  
256 representative sequences of all known *Blastocystis* sp. STs allowed the direct subtyping of the  
257 new isolates (Table 1). As stated above, for 32 of the 93 samples, cloning of the non-qPCR  
258 product was necessary for subtyping and 3 positive clones were arbitrarily selected and  
259 sequenced. For 14 of these 32 samples, the three sequenced clones were identical (Table 1).  
260 For 10 other samples presenting infection by a single ST, clones showed 1 to 14 nucleotide  
261 differences between them. As previously suggested [40,41], these nucleotide differences may  
262 reflect either coinfection with two isolates of the same ST or sequence variations between  
263 SSU rDNA gene copies within the same isolate [23]. Interestingly, the higher number of  
264 nucleotide difference between the clones (11 to 14) was observed in children infected by ST3.  
265 Recently, by analyzing and comparing respectively SSU rDNA sequences or data from  
266 multilocus sequence typing, Meloni et al. [44] and Stensvold et al. [54] revealed substantial  
267 intra-ST diversity in ST3 and more limited intra-ST2 and intra-ST4 variations. In either case,  
268 we have considered in the following analysis of our data that two different clones of the same  
269 ST identified in the same patient derived from the same isolate of *Blastocystis* sp. For the last  
270 8 samples, mixed infections with two (6 samples) or three STs (2 samples) were identified  
271 (Table 2). The majority of the subtyped samples included in the present study (85/93)  
272 represented single infections. With the addition of 8 mixed infections consisting of two or  
273 three different isolates, we analyzed a total of 103 isolates. As summarized in Table 3, ST3  
274 was the most common *Blastocystis* sp. ST in our Senegalese population (49.5%) followed by  
275 ST1 (28.2%), ST2 (20.4%) and ST4 (1.9%). The distribution of STs was almost similar  
276 between the three villages with a majority of infections attributable to ST3. The only  
277 significant difference was that ST1 followed at position 2 in Niandiane and Agniam Towguel  
278 and at position 3 in Fanaye Diery.

The distribution of *Blastocystis* sp. STs in Senegal is quite similar to that observed in a majority of countries all over the world with a predominance of ST3 followed by ST1 then ST2 or ST4 [5]. If we focused on the studies previously conducted in Africa, the only available reports concerned the ST distribution in Egypt [21,37,38], Libya, Nigeria, Liberia [2], and Tanzania [39], the latter survey only including 6 isolates (Figure 1). Globally, ST1, ST2, and ST3 represent around 82% of all 369 African isolates subtyped so far including those of the present study. ST3 is highly prevalent in African countries with an average of 46% of the 369 isolates. Consequently, because ST3 is rarely found in animals, a large-scale human-to-human transmission might likely explain the predominance of this ST in African countries as also in the rest of the world. Three studies conducted in different cities in Egypt and that in Liberia have identified ST3 as the predominant ST, as was true for our study population. However ST1 was detected with the highest frequency in Libya and Nigeria, and ST2 in Tanzania. Since ST1 and ST2 are frequently found in various animal groups including livestock [2,4,55], it can be hypothesized that a not yet evaluated proportion of human infections by both STs are of zoonotic origin. Interestingly ST4 was not detected in the studies reported in Egypt, Libya and Tanzania and its prevalence is quite low in Senegal (1.9%). Although ST4 was relatively frequent in Liberia (12%) and Nigeria (14%), these data confirmed that ST4 is much less frequently detected or absent in Africa while it is commonly found in Europe [5,34]. However, the reasons for the heterogeneous geographical distribution of ST4 remain unknown and its reservoir hosts have to be clarified. Additional STs including ST6 and ST7 were commonly found only in two studies carried out in Egypt [21,38]. Indeed, these STs were not detected in Senegal, Liberia, Nigeria, and Tanzania as in a third survey in Egypt [37] and only one isolate belonging to ST7 was identified in Libya. Both STs are usually hosted by birds (avian STs) [56] and rarely found in mammals. This was confirmed in

the present study. Given their apparent host specificity, it is highly likely that human infections by avian STs are of zoonotic origin.

The prevalence of mixed ST infections was 8.6% (8/93 samples) in our Senegalese cohort. This percentage is probably underestimated but roughly similar to that calculated (6%) by taking into account subtyped isolates from all epidemiological studies published to date (191 of 3171 samples) and listed by Alfellani et al. [5]. Mixed ST infections were found in all three villages of our study but with different proportions. In Agniam Towguel, only one mixed infection by 3 STs was found (ST1/ST2/ST3) (5.9%) while 4 mixed infections by 2 or 3 STs (10.5%) (ST2/ST3, ST3/ST4 and ST1/ST2/ST3) were recorded in Fanaye Diery. Regarding Niandane, 3 mixed infections by 2 STs (7.9%) were identified (ST1/ST2, ST1/ST4, and ST2/ST3) (Table 2). Mixed infections mostly corresponded to ST1, ST2, and ST3 isolates and were more likely to occur considering the high prevalence of each of these STs in our cohort. Curiously, the only two ST4 isolates of our study were identified in the context of mixed infections and not as part of single infections.

#### **Distribution of *Blastocystis* sp. STs in symptomatic and asymptomatic groups**

According to recent epidemiological reports, links between ST and pathogenicity are still matter of debate [8,29,33-36,41]. To highlight a possible relationship between ST and major intestinal symptoms associated with *Blastocystis* sp. infection (diarrhea, vomiting, and abdominal pain), the ST distribution was evaluated in our cohort of 93 symptomatic or asymptomatic children. Interestingly, the majority of children infected by *Blastocystis* sp. (54/93 or 58%) presented various gastrointestinal disorders as previously observed in a pediatric unit in Turkey [57]. In the following analysis, symptomatic (6) and asymptomatic (2) children presenting mixed infections by two or three STs were removed. Thereby the remaining 48 isolates from symptomatic children and 37 isolates from asymptomatic children

were considered (Table 4). The most dominant ST in both groups was ST3, and 63% of the ST3 isolates were found in symptomatic individuals. Predominance or high prevalence of ST3 in symptomatic groups of patients was also shown for instance in France [41], Australia [8], Turkey [57,58], and Iran [35]. Regarding ST1 and ST2 isolates, both STs were detected with equal frequency in the symptomatic and asymptomatic groups of our cohort (Chi square test,  $p=0.845$ ). However, ST1 was over-represented in groups of symptomatic individuals in previous epidemiological studies in China [59], Turkey [60], Iran [35], Egypt [21], and Lebanon [36]. Moreover, ST1 was the most prevalent ST in some cohorts presenting with IBS [38,61] and was shown to be pathogenic in rat models of blastocystosis [21]. In contrast, ST2 was not usually overrepresented in groups of symptomatic patients from different countries and Dogruman-Al et al. [57] suggested that ST2 was a non-pathogenic ST. However, in our study, the proportion of ST2 isolates in symptomatic patients was far from negligible. Moreover, all ST2 isolates identified in French and Australian sampling were from symptomatic individuals [8,41]. To complete our observations, it can also be underlined that the only two ST4 isolates found in our study were associated with symptoms but in the context of mixed ST infections (associated to ST1 or ST3). Therefore, the pathogenic potential of ST4 could not be assessed from our epidemiological data. However, a high prevalence of ST4 was recently found in Danish patients presenting with acute diarrhea [33] and Spanish symptomatic individuals [62]. Globally, no association between ST and symptom status was statistically significant from our present data.

#### **Potential risk factors for transmission of *Blastocystis* sp. within the Senegalese cohort**

The fecal-oral route is the main mode of transmission of *Blastocystis* sp. like the other common gastrointestinal parasites [1]. To reach a prevalence of 100% as in the present study, it is reasonable to argue that infection of Senegalese children by the parasite occurred through

multiple transmission sources. Although we did not had the opportunity to collect and analyze environmental (mainly water samples) and animal samples, it appears clear that individuals living in small communities in a rural area with modest socio-economic status (average income of 0.5 \$ per person per day in these Senegalese villages), poor hygiene sanitation, close contact with domestic animals and livestock, and water supply directly from well and river as in our study greatly increase their risks of infection by *Blastocystis* sp. Indeed, recent studies have revealed a human-to-human transmission coupled with a high prevalence of the parasite in a close community of girls in Thailand [13] as well as in a rural village in Nepal [14] whose description and environment (animals reared in or next to villager dwellings and rivers as water sources of the community) are quite similar to those of Senegalese villages. In this context, zoonotic transmission of *Blastocystis* sp. would be another significant source of infection due to the wide range of animals potentially infected with the parasite and in close contact with humans [2,4,55,56]. However the impact of this mode of transmission through contact with contaminated animal fecal materials coupled with poor hand hygiene of villagers remains difficult to quantify therefore that it involves STs frequently found in humans (ST1 to ST4) as in the present study. Finally, there is a concern that water should be a main source of infection by *Blastocystis* sp. although large-scale waterborne outbreaks involving the parasite have not yet been documented. Ability of *Blastocystis* sp. cysts, the only transmissible stage of this parasite to survive for long periods of time in the environment together with their low size [1,15] represent some factors that favor waterborne transmission of the parasite. In 2006, *Blastocystis* sp. has also been added by the World Health Organization to the list of waterborne parasites [63]. *Blastocystis* sp. was previously reported in drinking water, rivers, tanks, and sewage samples [11,12,14,15,64]. Interestingly, in these latter studies, the same STs were identified in both the water samples and the stools of consumers providing evidence for water transmission. In the Senegalese villages of the present study, river and wells

represent the main water sources for drinking and cooking purposes as well as for bathing of the population. Consequently, water sources of this community potentially contaminated with human and animal feces, may largely facilitate transmission of *Blastocystis* sp. and should be considered as serious potential threats to consumers. Further, the analysis of fecal samples from animals living in or near the Senegalese villages and of water samples would help to confirm their epidemiological importance as sources of infection and contamination for inhabitants.

## Conclusions

To our knowledge, this is the first investigation of prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in Senegal that, moreover, greatly expands the few data available on molecular epidemiology of this parasite in Africa. In this country, the prevalence of *Blastocystis* sp. in a cohort of children living in a rural area reached a peak of 100% never achieved before. Such high prevalence may reflect different exposure of individuals to animal (zoonosis) and environmental (waterborne) sources of infection together with large-scale human-to-human transmission. This study also raises questions about the real pathogenicity of *Blastocystis* sp. since more than half of children infected by this parasite presented various gastrointestinal symptoms and highlights the socioeconomic impact of blastocystosis in developing countries with low environmental conditions and quality of life. Finally, this epidemiological survey provides necessary information to public health authorities for urgently setting prevention (water quality assessments and primary education of dwellers regarding the modes of transmission) and control programs that should help to reduce the burden of *Blastocystis* sp.

## List of abbreviations

ST, subtype; IBS, Irritable Bowel Syndrome

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

LG and MS collected stools and patient data and helped in drafting the manuscript. DES, DM, AC, PP and IW collected and analyzed PCR and sequence data and helped in drafting the manuscript. EV, GR, MH, LD, FDe and FDa conceived, designed and coordinated the study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Programme Orientations Stratégiques from the University of Lille 2, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur of Lille and the Biomedical Research Center EPLS (Sn). DES and MO were both supported by PhD fellowships from the Conseil National de la Recherche Scientifique and the Azm & Saade Association from Lebanon, DM by a PhD fellowship from the Regione Autonoma della Sardegna and a post-doctoral grant from the Japanese Society for Promotion of Science (JSPS) and AC by a PhD fellowship from the Ministère Français de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

### **References**

1. Tan KS: **New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp.** *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**:639–665.



- 428 2. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR,  
429 Clark CG: **Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals.** *Protist*  
430 2013, **164**:497–509.
- 431 3. Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, Levecke  
432 B, Tannich E, Clark CG, Stensvold CR: **Diversity and distribution of *Blastocystis***  
433 **sp. subtypes in non-human primates.** *Parasitology* 2013, **140**:966–971.
- 434 4. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J: **Subtype distribution of *Blastocystis* isolates**  
435 **from a variety of animals from South Wales, Australia.** *Vet Parasitol* 2013,  
436 **196**:85–89.
- 437 5. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF,  
438 Clark CG: **Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its**  
439 **potential implications.** *Acta Trop* 2013, **126**:11–18.
- 440 6. Pegelow K, Gross R, Pietrzik K, Lukito W, Richards AL, Fryauff DJ: **Parasitological**  
441 **and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java,**  
442 **Indonesia.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997, **28**:173–190.
- 443 7. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR:  
444 ***Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia.** *Infect*  
445 *Genet Evol* 2013, doi:pii: S1567-1348(13)00286-4. 10.1016/j.meegid.2013.07.020.  
446 [Epub ahead of print].
- 447 8. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J: **Subtype distribution of *Blastocystis* isolates**  
448 **identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*.** *Eur J*  
449 *Clin Microbiol Infect Dis* 2013, **32**:335–343.
- 450 9. Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, van Vugt M,  
451 Goorhuis A, van Gool T: **Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442**  
452 **patients in a hospital setting in the Netherlands.** *BMC Infect Dis* 2013, **13**:389.

- 453 10. Li LH, Zhou XN, Du ZW, Wang XZ, Wang LB, Jiang JY, Yoshikawa H, Steinmann  
454 P, Utzinger J, Wu Z, Chen JX, Chen SH, Zhang L: **Molecular epidemiology of**  
455 **human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China.** *Parasitol Int* 2007,  
456 **56:281–286.**
- 457 11. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P,  
458 Mungthin M: **Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1**  
459 **infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand.** *Am J Trop*  
460 *Med Hyg* 2008, **79:401–406.**
- 461 12. Eroglu F, Koltas IS: **Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using**  
462 **PCR method.** *Parasitol Res* 2010, **107:841–845.**
- 463 13. Thathaisong U, Siripattanapipong S, Mungthin M, Pipatsatitpong D, Tan-ariya P,  
464 Naaglor T, Leelayoova S: **Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the**  
465 **home for girls, Bangkok, Thailand.** *Am J Trop Med Hyg* 2013, **88:352-358.**
- 466 14. Lee LL, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK: ***Blastocystis* sp.: waterborne**  
467 **zoonotic organism, a possibility?** *Parasit Vectors* 2012, **5:130.**
- 468 15. Suresh K, Smith H, Tan T: **Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian**  
469 **sewage samples.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71:5619–5620.**
- 470 16. Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, Kanbara H:  
471 **Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus**  
472 **monkeys in Kathmandu, Nepal.** *Vet Parasitol* 2009, **160:295–300.**
- 473 17. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J,  
474 Drake B, Thompson RC: **Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from**  
475 **zoo animals and their animal-keepers.** *Vet Parasitol* 2010, **169:8–17.**
- 476 18. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh  
477 M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E: **Molecular**

- phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol* 2005, **43**:348–355.
19. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG: **Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus.** *Trends Parasitol* 2007, **23**:93–96.
  20. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El AH, Delbac F, Livrelli V: **Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies.** *J Clin Microbiol* 2011, **49**:975–983.
  21. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM: **Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* egyptian isolates in experimentally infected rats.** *Parasitol Res* 2008, **102**:853–860.
  22. Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, Wu B, MacAry PA: **Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp.** *Curr Infect Dis Rep* 2010, **12**:28–35.
  23. Denoeud F, Roussel M, Noël B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier-Armamet C, Couloux A, Poulain J, Segurans B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng GC, Tan KSW, Antiguenave F, Jaillon O, Aury J, Delbac F, Wincker P, Vivarès CP, El Alaoui H: **Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite.** *Genome Biol* 2011, **12**:R29.
  24. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR: **Recent developments in *Blastocystis* research.** *Adv Parasitol* 2013, **82**:1–32.
  25. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, El AH: **New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002545.

- 503 26. Mirza H, Wu Z, Teo JDW, Tan KSW: **Statin pleiotropy prevents rho kinase-**  
504 **mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine**  
505 **proteases.** *Cell Microbiol* 2012, **14**:1474–1484.
- 506 27. Wawrzyniak I, Texier C, Poirier P, Viscogliosi E, Tan KS, Delbac F, El Alaoui H:  
507 **Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human**  
508 **intestinal parasite.** *Parasitol Int* 2012, **61**:437–442.
- 509 28. Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou  
510 XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS: **Oh my aching gut: irritable bowel**  
511 **syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection.** *Parasit Vectors* 2008, **1**:40.
- 512 29. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzgen A, Stopsack K, Heinrich-Grafe U,  
513 Pohlmann C: ***Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of**  
514 **gastrointestinal and urticarial symptoms.** *Parasitol Int* 2010, **59**:469–471.
- 515 30. Verma R, Delfanian K: ***Blastocystis hominis* associated acute urticaria.** *Am J Med*  
516 *Sci* 2013, **346**:80–81.
- 517 31. Tan TC, Ong SC, Suresh KG: **Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates**  
518 **obtained from cancer and HIV/AIDS patients.** *Parasitol Res* 2009, **105**:1283–1286.
- 519 32. Batista MW, Pierrotti LC, Abdala E, Clemente WT, Girao ES, Rosa DRT, Ianhez LE,  
520 Bonazzi PR, Lima AS, Fernandes PFCBC, Padua-Neto MV, Bacchella T, Oliveira  
521 APP, Viana CFG, Ferreira MS, Shikanai-Yasuda MA: **Endemic and opportunistic**  
522 **infections in Brazilian solid organ transplant recipients.** *Trop Med Int Health* 2011,  
523 **16**:1134–1142.
- 524 33. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KEP, Nielsen HV: ***Blastocystis* sp. subtype 4**  
525 **is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute**  
526 **diarrhea.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **84**:883–885.

- 527 34. Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark CG, Evengard B: **Subtype analysis of**  
528 ***Blastocystis* isolates in Swedish patients.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012,  
529 **31:1689–1696.**
- 530 35. Moosavi A, Haghighi A, Nazemalhosseini Mojarad E, Zayeri F, Alebouyeh M,  
531 Khazan H, Kazemi B, Zali MR: **Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from**  
532 **symptomatic and asymptomatic individuals in Iran.** *Parasitol Res* 2012, **111:2311–**  
533 **2315.**
- 534 36. El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, Wawrzyniak I, Delbac  
535 F, El Alaoui H, Delhaes L, Dei-Cas E, Mallat H, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi  
536 E: **Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between**  
537 **subtype 1 and gastrointestinal symptoms.** *Am J Trop Med Hyg* 2013, **88:1203–**  
538 **1206.**
- 539 37. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Delbac F, Boorom  
540 K, Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E: **Subtype analysis of *Blastocystis* isolates**  
541 **from symptomatic patients in Egypt.** *Parasitol Res* 2010, **106:505–511.**
- 542 38. Fouad SA, Basyoni MM, Fahmy RA, Kobaisi MH : **The pathogenic role of different**  
543 ***Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel**  
544 **syndrome.** *Arab J Gastroenterol* 2011, **12:194–200.**
- 545 39. Petrasova J, Uzlikova M, Kostka M, Petrzalkova KJ, Huffman MA, Modry D:  
546 **Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo**  
547 **Island, Tanzania.** *Int J Parasitol* 2011, **41:1113–1120.**
- 548 40. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG: **DNA barcoding of *Blastocystis*.** *Protist* 2006,  
549 **157:77–85.**

- 550 41. Souppart L, Sancier G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E,  
551 Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E: **Molecular epidemiology of human**  
552 ***Blastocystis* isolates in France.** *Parasitol Res* 2009, **105**:413–421.
- 553 42. Stensvold CR: ***Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnosis**  
554 **and epidemiology.** *Trop Parasitol* 2013, **3**:26–34.
- 555 43. Stensvold CR: **Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-**  
556 **site PCR for *Blastocystis* subtyping.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**:190–194.
- 557 44. Meloni D, Poirier P, Mantini C, Noël C, Gantois N, Wawrzyniak I, Delbac F, Chabé  
558 M, Delhaes L, Dei-Cas E, Fiori PL, El Alaoui H, Viscogliosi E: **Mixed human intra-**  
559 **and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp.** *Parasitol Int* 2012,  
560 **61**:719–722.
- 561 45. Velasco J, Gonzalez F, Diaz T, Pena-Guillen J, Araque M: **Profiles of**  
562 **enteropathogens in asymptomatic children from indigenous communities of**  
563 **Merida, Venezuela.** *J Infect Dev Ctries* 2011, **5**:276–285.
- 564 46. Machicado JD, Marcos LA, Tello R, Canales M, Terashima A, Gotuzzo E: **Diagnosis**  
565 **of soil-transmitted helminthiasis in an Amazonian community in Peru using**  
566 **multiple diagnostic techniques.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012, **106**:333–339.
- 567 47. Saksirisampant W, Nuchprayoon S, Wiwanitkit V, Yenthakam S, Ampavasiri A:  
568 **Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Patum Thani**  
569 **province.** *J Med Assoc Thai* 2003, **86**:S263–S270.
- 570 48. Gualdieri L, Rinaldi L, Petrullo L, Morgogliione ME, Maurelli MP, Musella V,  
571 Piemonte M, Caravano L, Coppola MG, Cringoli G: **Intestinal parasites in**  
572 **immigrants in the city of Naples (southern Italy).** *Acta Tropica* 2011, **117**:196–201.

49. Alfellani MA, Khan AH, Al-Gazaoui RM, Zaid MK, Al-Ferjani MA: **Prevalence and clinical features of *Blastocystis hominis* infection among patients in Sebha, Libya.** *Sultan Qaboos Univ Med J* 2007, **7**:35–40.
50. Faye O, Ndir O, Dieng T, Gaye O, Bah IB, Dieng Y, Faye I, Diallo S: **Cryptosporidiosis among intestinal parasitosis in Senegalese pediatric hospital patients.** *Dakar Med* 1993, **38**:129–132.
51. Gaye O, Ndir O, Kane A, Belmachi R, Ndiaye M, Diouf M, Diedhiou M, Diallo S: **Intestinal parasitic diseases and tinea of the scalp in Dakar school population: influence of environmental factors on the infestation level.** *Dakar Med* 1994, **39**:57–61.
52. Salem G, van de Velden L, Laloé F, Maire B, Ponton A, Traissac P, Prost A: **Intestinal parasitic diseases and environment in Sahelo-Sudanese towns : the case of Pikine (Senegal).** *Rev Epidemiol Santé Publique* 1994, **42**:322–333.
53. Ndir I, Gaye A, Sy M, Gaye O, Ndir O: **Prevalence of intestinal parasites at the King Baudouin health center of Guediawaye (Senegal).** *Dakar Med* 2002, **47**:168–171.
54. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG: **Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes.** *Infect Genet Evol* 2012, **12**:263–273.
55. Tian CT, Tan PC, Sharma R, Sugnaseelan S, Suresh KG: **Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia.** *Parasitol Res* 2013, **112**:85–89.
56. Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG: **Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype.** *Int J Parasitol* 2009, **39**:473–479.

57. Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt Ö, Demirel M: **A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2008, **103**:685–689.**
58. Özyurt M, Kurt Ö, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR: **Molecular epidemiology of *Blastocystis* infection in Turkey. *Parasitol Int* 2008, **57**:300–306.**
59. Li J, Deng T, Li X, Cao G, Li X, Yan Y: **A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitol Res* 2013, **112**:3537–3541.**
60. Eroglu F, Gene A, Elgun K, Koltas IS: **Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol Res* 2009, **105**:1589–1592.**
61. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R: **Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2010, **106**:1033–1038.**
62. Dominguez-Marquez MV, Guna R, Munoz C, Gomez-Munoz MT, Borrás R: **High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol Res* 2009, **105**:949–955.**
63. World Health Organization: **Microbial fact sheets.** In *World Health Organization Guidelines for Drinking Water quality (WHOGDWQ)*. 4th Edition. Malta: Gutenberg; 2011:271–273.
64. Leelayoova S, Rangsin R, Taamasri P, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin. **Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *Am J Trop Med Hyg* 2004, **70**:658–662.**



Figure legends

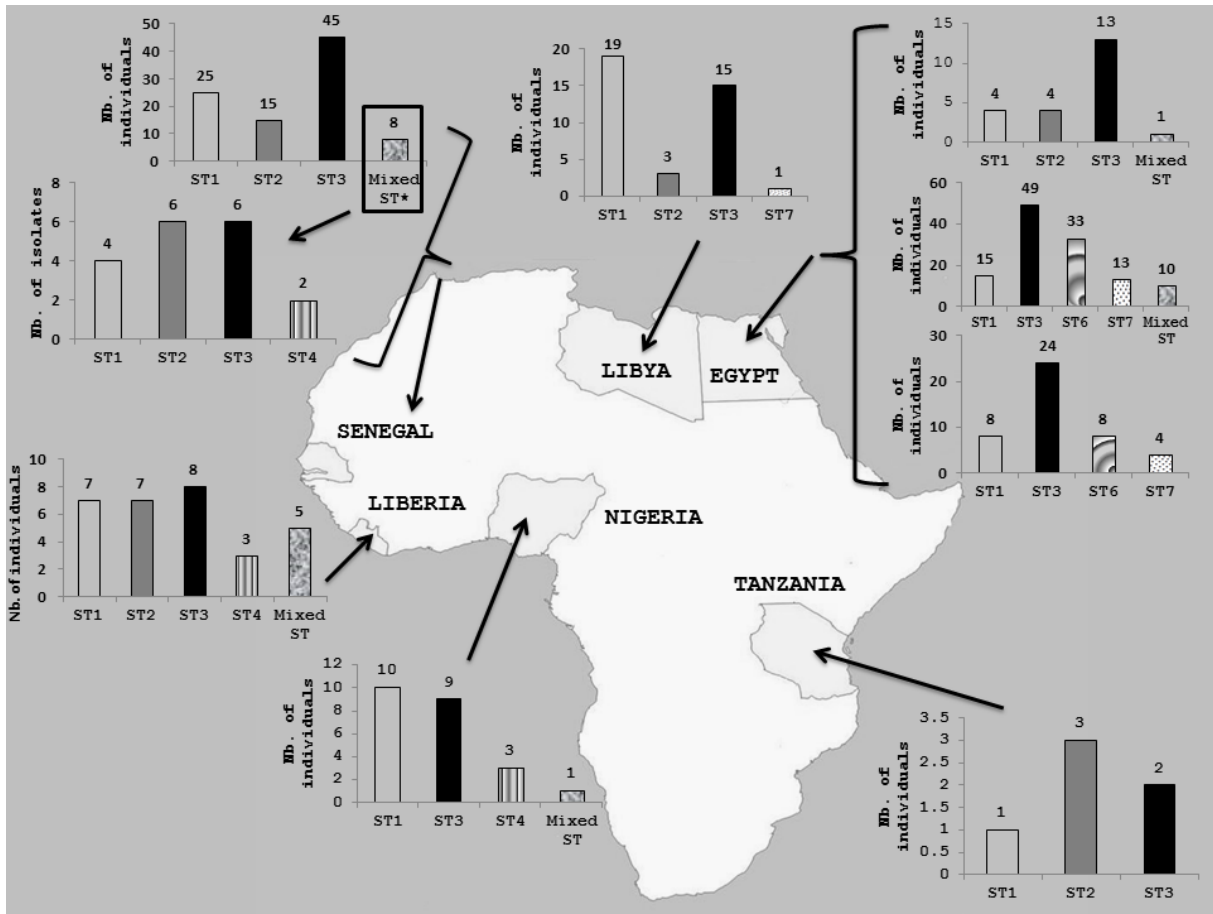


Figure 1. Distribution of *Blastocystis* sp. STs across African countries. In the case of Senegal, distribution of STs in mixed infections indicated by an asterisk in the histogram was detailed.

627 **Table 1 Clinical data and *Blastocystis* sp. STs among symptomatic and asymptomatic patients in Senegal**

<b>Patients</b>	<b>Sex/age</b>	<b>Symptoms</b>	<b><i>Blastocystis</i> sp. ST by non-qPCR<sup>a</sup></b>	<b>Nucleotide differences<sup>b</sup></b>	<b><i>Blastocystis</i> sp. ST by qPCR</b>	<b>Accession no.</b>
DSS1	M/6.2	Abdominal pain			1	KF848509
DSS2	F/5.9	Abdominal pain Diarrhea	3 (Sc)	0		KF848510
DSS3	M/6.8		3 (Sc)			KF848511
DSS4	F/6.1	Abdominal pain Vomiting	1 (Sc)			KF848512
DSS5	M/8.3				3	KF848513
DSS6	M/7.3	Abdominal pain Diarrhea	1 (Sc)			KF848514
DSS7	F/5.9				3	KF848515
DSS8	M/6.8	Abdominal pain Vomiting	1 (Sc)			KF848516
DSS9	F/9.2	Abdominal pain			3	KF848517
DSS10	M/9.7	Vomiting	3 (Sc)	0		KF848518
DSS11	F/10	Diarrhea Vomiting	3 (Sc)			KF848519
DSS12	M/8.8	Abdominal pain Vomiting			3	KF848520

DSS13	F/8.6	Abdominal pain	1 (Sc)			KF848521
DSS14	M/7		2 (Sc)	0		KF848522
DSS15	F/7.7		2 (Sc)			KF848523
DSS16	M/6.9				3	KF848524
DSS17	F/7.7				3	KF848525
DSS18	F/6.1		3 (Sc)	0 to 14		KF848526-7
DSS19	M/8.7				2	KF848528
DSS20	M/9.7	Abdominal pain	2 (Sc)			KF848529
DSS21	F/6	Abdominal pain	1 (Sc)			KF848530
DSS22	M/10.1	Abdominal pain	3 (Sc)			KF848531
DSS23	M/7.7		Mixed 2 and 3 (P)	0		KF848532-3
DSS24	F/6.4		1 (Sc)			KF848534
DSS25	F/9.6	Abdominal pain	Mixed 3 and 4 (Sc)	0 to 4		KF848535-7
DSS26	F/6.5	Abdominal pain	Mixed 1, 2 and 3(Sc)			KF848538-40
DSS27	M/7.2		3 (Sc)			KF848541
DSS28	M/8		3 (Sc)			KF848542
DSS29	F/7.3				2	KF848543
DSS30	M/5.8	Abdominal pain			1	KF848544
DSS31	F/8.6	Abdominal pain	2 (Sc)			KF848545
DSS32	M/6.6		3 (Sc)			KF848546
DSS33	M/7.7	Abdominal pain	Mixed 2 and 3 (Sc)	0		KF848547-8

DSS34	M/9.5	Vomiting	3 (Sc)			KF848549
DSS35	M/7.7	Abdominal pain	3 (Sc)	0		KF848550
DSS36	F/5.9	Abdominal pain	3 (Sc)			KF848551
DSS37	M/7.4		2 (Sc)	0		KF848552
DSS38	F/9.7	Abdominal pain	1 (Sc)	0		KF848553
		Diarrhea				
		Vomiting				
DSS39	F/9.8	Abdominal pain			3	KF848554
DSS40	F/9.9	Abdominal pain	2 (Sc)			KF848555
		Diarrhea				
		Vomiting				
DSS41	F/9.7	Vomiting	3 (Sc)	0		KF848556
DSS42	F/10.2	Abdominal pain	1 (Sc)			KF848557
		Diarrhea				
DSS43	M/9.3		2 (Sc)			KF848558
DSS44	M/10	Abdominal pain	3 (Sc)			KF848559
DSS45	F/8.9	Abdominal pain	3 (Sc)	0 to 14		KF848560-1
DSS46	F/10.2	Abdominal pain			3	KF848562
DSS47	F/10		3 (Sc)	0		KF848563
DSS48	M/9.8		3 (Sc)	0		KF848564

DSS49	F/10		2 (Sc)			KF848565
DSS50	F/10.2				1	KF848566
DSS51	M/9.4		1 (Sc)			KF848567
DSS52	M/9	Abdominal pain	1 (Sc)			KF848568
DSS53	F/8.1		1 (Sc)			KF848569
DSS54	M/8.5		Mixed 1 and 2 (Sc)	0		KF848570-1
DSS55	M/9.1	Abdominal pain	3 (Sc)			KF848572
DSS56	F/8.6		1 (Sc)			KF848573
DSS57	F/9.7	Abdominal pain	2 (Sc)			KF848574
DSS58	M/9.3	Abdominal pain	2 (Sc)			KF848575
DSS59	M/8.9	Abdominal pain	3 (Sc)			KF848576
DSS60	F/8.8		3 (Sc)			KF848577
DSS61	M/9.9				1	KF848578
DSS62	F/9.5	Abdominal pain			1	KF848579
DSS63	M/8.5	Abdominal pain	1 (Sc)			KF848580
DSS64	M/6.2	Abdominal pain	3 (Sc)			KF848581
DSS65	M/9.8		1 (Sc)			KF848582
DSS66	F/9.9	Abdominal pain	2 (Sc)			KF848583
DSS67	F/6.1	Abdominal pain	Mixed 1 and 4 (Sc)	0		KF848584-5
DSS68	F/6.1		1 (Sc)	0		KF848586

DSS69	F/6.8				1	KF848587
DSS70	F/7.8	Abdominal pain	3 (Sc)			KF848588
DSS71	F/6.7	Abdominal pain			3	KF848589
DSS72	M/6	Abdominal pain	3 (Sc)			KF848590
		Vomiting				
DSS73	F/7	Abdominal pain	3 (Sc)	0		KF848591
DSS74	M/8.5				3	KF848592
DSS75	M/5.9	Abdominal pain			3	KF848593
DSS76	M/8.1	Abdominal pain			1	KF848594
DSS77	M/6.6	Abdominal pain	3 (Sc)	2 to 12		KF848595-7
DSS78	M/6.9	Abdominal pain			2	KF848598
DSS79	M/8.4		3 (Sc)	0 to 11		KF848599-600
DSS80	M/6.1				3	KF848601
DSS81	F/5.9	Abdominal pain	Mixed 2 and 3 (Sc)	0		KF848602-3
DSS82	F/9.8	Abdominal pain	3 (Sc)	0		KF848604
DSS83	M/6.4				1	KF848605
DSS84	F/9.2		2 (Sc)			KF848606
DSS85	F/6.8	Abdominal pain	3 (P)	3 to 5		KF848607-9
		Vomiting				
DSS86	F/6.6	Abdominal pain	Mixed 1, 2 and 3 (P)			KF848610-2
DSS87	M/9.9	Abdominal pain	3 (P)	0		KF848613

DSS88	M/9.5		1 (P)	0 to 1	KF848614-5
DSS89	F/9.1	Diarrhea	3 (P)	0	KF848616
DSS90	F/9.5		3 (P)	0 to 1	KF848617-8
DSS91	F/9.4		1 (P)	0 to 3	KF848619-20
DSS92	F/6.1	Abdominal pain	3 (P)	0 to 3	KF848621-2
		Diarrhea			
DSS93	M/6		3 (P)	0 to 1	KF848623-4

628 <sup>a</sup>According to the standard terminology including 17 STs [2]; (Sc) and (P): non qPCRs using the primer pair described by Scicluna et al.  
629 [40] and Poirier et al. [20], respectively.  
630 <sup>b</sup>Determined in the common region of clones belonging to the same ST and sequenced for each sample

631 **Table 2 Single and mixed ST infections with *Blastocystis* sp. identified in the Senegalese cohort**

Villages	<i>Blastocystis</i> sp. STs								Total no.
	ST1	ST2	ST3	ST1/ST2	ST1/ST4	ST2/ST3	ST3/ST4	ST1/ST2/ST3	
Agniam Towguel	5	2	9	0	0	0	0	1	17
Niandane	13	5	17	1	1	1	0	0	38
Fanaye Diery	7	8	19	0	0	2	1	1	38
<b>Total no.</b>	<b>25</b>	<b>15</b>	<b>45</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>93</b>

632

633

634 **Table 3 *Blastocystis* sp. ST distribution among Senegalese villages**

Villages	<i>Blastocystis</i> sp. STs (%)				Total no.
	ST1	ST2	ST3	ST4	
Agniam Towguel	6	3	10	0	19
Niandane	15	7	18	1	41
Fanaye Diery	8	11	23	1	43
<b>Total no. (%)</b>	<b>29 (28.1)</b>	<b>21 (20.3)</b>	<b>51 (49.5)</b>	<b>2 (1.9)</b>	<b>103</b>

635

636

637 **Table 4 Distribution of *Blastocystis* sp. STs among symptomatic and asymptomatic children groups**

Group	<i>Blastocystis</i> sp. STs (%)				Total no.
	ST1	ST2	ST3	Mixed infections	
Symptomatic	13 (24)	7 (13)	28 (52)	6 (11)	54
Asymptomatic	12 (31)	8 (20)	17 (44)	2 (5)	39
<b>Total no (%)</b>	<b>25 (27)</b>	<b>15 (16)</b>	<b>45 (48)</b>	<b>8 (9)</b>	<b>93</b>



### I.5. Analyse de la population totale en France

**Préambule :** Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de rédaction pour soumission au journal « Eurosurveillance ».

#### I.5.1. Introduction

Les données de prévalence concernant *Blastocystis* sp. sont maintenant disponibles dans de nombreux pays à travers le monde mais restent curieusement assez limitées dans les pays européens et en particulier en France. Aussi, dans le cadre d'une collaboration nationale incluant 11 centres hospitaliers répartis sur tout le territoire français, une large étude épidémiologique coordonnée par BDPEE a été menée visant à (i) déterminer la prévalence et la distribution des STs du parasite, (ii) mettre en évidence d'éventuelles variations géographiques ou saisonnières et (iii) rechercher les facteurs de risques liés au portage de *Blastocystis* sp.

#### I.5.2. Matériels et méthodes et résultats

Cette partie est résumée dans le rapport d'étude qui suit et qui a été envoyé en date du 15 Juillet 2014 à chacun des centres partenaires de cette étude.

# Enquête épidémiologique *Blastocystis* sp.

## Centres participants

### Référents

**Besançon** – Dr Anne-Pauline Bellanger

**Créteil** - Dr Françoise Botterel

**Clermont-Ferrand** – Dr Philippe Poirier

**Lille** – Dr Laurence Delhaes

**Lyon** – Dr Meja Rabodonirina

**Montpellier** – Pr Patrick Bastien

**Nantes** – Dr Florent Morio

**Nice** – Dr Christelle Pomares

**Nîmes** – Dr Laurence Lachaud

**Strasbourg** – Pr Ermanno Candolfi

**Tours** – Dr Guillaume Desoubeaux

# RAPPORT D'ETUDE

## Coordinateurs

**Dr Eric Viscogliosi** – Institut Pasteur Lille  
[eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr](mailto:eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr)

**Dr Laurence Delhaes** – CHU Lille  
[Laurence.Delhaes@pasteur-lille.fr](mailto:Laurence.Delhaes@pasteur-lille.fr)

**Dr Philippe Poirier** – CHU Clermont-Ferrand  
[ppoirier@chu-clermontferrand.fr](mailto:ppoirier@chu-clermontferrand.fr)

## Etudiants impliqués

**Dima El Safadi** – Institut Pasteur Lille

**Amandine Cian** – Institut Pasteur Lille

# RESULTATS

---

## Description de l'étude et objectifs

*Blastocystis* sp. est un parasite unicellulaire anaérobie appartenant au phylum des Straménopiles. Ce parasite intestinal est retrouvé chez l'homme et d'autres mammifères, mais également chez les oiseaux, les batraciens, les reptiles et les insectes. A l'heure actuelle, au moins 17 sous-types (STs) de *Blastocystis* sp. ont été décrits sur la base de la comparaison des séquences du gène codant l'ARNr 18S. Un même ST peut infecter différents hôtes, même s'il existe une distribution préférentielle des STs au sein du règne animal. Ainsi, bien que les ST1 à ST9 aient été retrouvés chez l'homme, les ST1 à ST4 sont les plus fréquemment isolés, le ST3 étant le principal ST humain. Néanmoins, des différences de distribution entre ces STs sont observées, que ce soit entre les continents ou les pays, et même entre les régions d'un même pays. Ainsi, lors d'une étude menée au CHU de Lille en 2009 sur 40 isolats de *Blastocystis*, le ST3 était classiquement retrouvé comme le ST majoritaire (Souppart et al. 2009) alors qu'une étude menée à Clermont-Ferrand rapportait une forte prévalence du ST4 (Poirier et al. 2011).

Différents travaux ont montré que la prévalence de *Blastocystis* sp. chez l'homme variait selon les régions du monde, l'âge des patients ou encore leur statut immunitaire. La notion de voyage semble également être un point clé. Néanmoins, il n'a encore jamais été réalisé d'étude à grande échelle dans un pays à haut niveau socio-économique tel que la France. De plus, la plupart des études publiées utilisent des techniques microscopiques ou culturales dont la sensibilité variable peut largement sous-estimer la prévalence réelle de la parasitose. En effet, la PCR constitue à l'heure actuelle la méthode de référence pour la recherche de *Blastocystis* sp.

Les objectifs de cette enquête épidémiologique étaient (i) d'étudier la prévalence de *Blastocystis* sp. en France par PCR en temps réel sur un nombre significatif d'échantillons de selles collectés dans différentes régions géographiques, (ii) d'établir une cartographie globale de la distribution des STs en France, mais également d'étudier les différences entre régions de recrutement et (iii) de rechercher les facteurs de risques associés au portage de *Blastocystis* sp. à partir des données épidémiologiques relatives à chaque isolat.

# RESULTATS

---

## Matériels et méthodes

**Echantillons de selles.** Chaque centre participant a collecté prospectivement des échantillons de selles du 28/12/2013 au 21/03/2013 (campagne d'hiver) et du 01/07/2013 au 12/10/2013 (campagne d'été). Pour chaque échantillon de selles, *Blastocystis* sp. a été recherché par microscopie dans chacun des laboratoires participants et un questionnaire épidémiologique a été complété (**Annexe 3**). Un échantillon de chaque selle a été suspendu dans du tampon de conservation S.T.A.R Buffer (Roche) avec un ratio de 1:3 selon les recommandations du fabricant. Ces aliquots ont été congelés à -20°C puis adressés à l'Institut Pasteur de Lille.

**Extractions d'ADN.** Après centrifugation 1 min à 1000 g des selles conservées en S.T.A.R Buffer, l'ADN total a été extrait à partir de 200 µl de surnageant de selles à l'aide du QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Un volume d'élution de 100 µl a été utilisé. Les extraits d'ADNs ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

**Recherche de *Blastocystis* sp. par PCR en temps réel.** La recherche de *Blastocystis* sp. a été réalisée selon la méthode décrite par Poirier et al. (2011). Cette PCR cible une séquence d'environ 330 pb du gène codant l'ARNr 18S. Brièvement, les PCRs ont été réalisées sur un appareil Rotorgene 6000 (Corbett Life Science) dans un volume final de 20 µl contenant 0,5 µM de chaque primer (BL18SPPF1 5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA-3' et BL18SR2PP 5'-TCTTCGTTACCCGTTAC TGC-3'), 3,65 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de LC-FastStart DNA Master SYBR green kit (Roche Diagnostics) et 1 µl d'ADN. Après une dénaturation de 5 min à 95°C, l'amplification a été réalisée par 45 cycles de 5 sec à 95°C, 10 sec à 68°C et 15 sec à 72°C.

**Sous-typage des isolats.** Les produits de PCR ont été séquencés dans les 2 sens par la société Beckman Coulter Genomics (Essex, Royaume-Uni). Les séquences obtenues ont été analysées par le logiciel BioEdit v7.0.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu:BioEdit/bioedit.html>) et soumises à la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ces séquences ont été comparées à l'aide du programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) à celles d'isolats de *Blastocystis* sp. disponibles dans la base de données GenBank et de STs connus. Cette comparaison nous a permis de déterminer le ST des isolats positifs. Les séquences présentant une superposition de chromatogrammes ont été considérées comme des infections mixtes par 2 STs parasites.

## RESULTATS

**Analyse statistique.** Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Stata (version 13, StataCorp, College Station, USA). Les données qualitatives sont exprimées en effectifs et fréquences associées et sont comparées entre groupes indépendants par le test du Chi2 ou le test exact de Fisher. Les données quantitatives, exprimées par la moyenne et écart-type associé, sont comparées entre les groupes par le test de Student ou le test de Mann-Whitney (si conditions du t-test non respectées : normalité vérifiée par test de Shapiro-Wilk et homoscedasticité par le test de Fisher-Snedecor). Tous les tests statistiques sont bilatéraux et un  $p < 0,05$  est considéré comme significatif.

### Résultats

#### 1. Description de la population

##### 1.1. Cohorte

Au total, 788 échantillons de selles ont été collectés lors des 2 campagnes (Tableau 1).

Centres	Nombre d'échantillons		
	Hiver	Eté	Total
Besançon	48	41	89
Clermont-Ferrand	50	50	100
Créteil	29	29	58
Lille	30	21	51
Lyon	38	44	82
Montpellier	30	29	59
Nantes	49	42	91
Nice	33	30	63
Nîmes	30	-	30
Strasbourg	50	48	98
Tours	30	37	67
Total	417	371	788

**Tableau 1 :** Nombre d'échantillons collectés par centre.

## RESULTATS

Le sexe ratio H/F de la population étudié était de 1,37 (456 hommes et 332 femmes) avec un âge moyen de  $45,7 \pm 21,3$  ans.

### 1.2. Voyage

Au moins 178 échantillons de selles provenaient de patients ayant voyagés en dehors de la France durant l'année précédente (Tableau 2).

	Non	Oui	Données manquantes
<b>Voyage &lt;1an</b>	457	178	153

**Tableau 2 : Nombre de patients ayant voyagés ou non l'année précédente.**

### 1.3. Statut immunitaire des patients

Dans notre cohorte, 44,5% des échantillons de selles étaient issus de patients immunocompétents (351/788) et 48,0% de patients présentant un facteur d'immunodépression (378/788). Les facteurs d'immunodépression répertoriés (Tableau 3) étaient une sérologie VIH positive, un antécédent de transplantation d'organe solide ou de moelle osseuse, un contexte de néoplasie (y compris hémopathies) et la présence d'un traitement immunosuppresseur.

	Immunodéprimés	Immunocompétents	Données manquantes
<b>Statut immunitaire</b>	<b>378</b>	<b>351</b>	<b>59</b>
VIH	58		
TOS	95		
IS	131		
GMO	65		
Cancers / hémopathies	34		

*TOS : Transplantation d'organe solide ; IS : traitement immunosuppresseur ; GMO : greffe de moelle osseuse.*

**Tableau 3 : Statut immunitaire des patients et facteurs d'immunodépression.**

### 1.4. Pathologies intestinales connues

Au total, 5,1% (40/788) des patients recrutés présentaient un antécédent connu de pathologie intestinale chronique, dont 3,2% de maladies inflammatoires chroniques intestinales et 1,9% de syndromes de l'intestin irritable.

## RESULTATS

### 1.5. Aspect macroscopique des selles collectées

Sur les 788 selles collectées (Tableau 4), 26,1% (206/788) présentaient un aspect moulé, 25,3% étaient liquides, 43,4% molles et seulement 3,3% étaient dures.

	Liquide	Molle	Moulée	Dure	Données manquantes
Aspect des selles	199	342	206	26	15

**Tableau 4 : Aspect macroscopique des selles collectées pendant l'étude.**

### 1.6. Symptomatologie digestive des patients inclus dans l'étude

Sur les 63,7% (502/788) de patients présentant une symptomatologie digestive (Tableau 5), 52,4% (413/788) se plaignaient de diarrhées, 29,9% (236/788) de douleurs abdominales, 6,7% (53/788) de ballonnements, 3,6% (28/788) de constipation et 3,3% (26/788) de vomissements.

	Oui	Non	Données manquantes
Symptômes digestifs	502	234	52
Douleurs abdominales	236		
Diarrhées	413		
Ballonnements	53		
Constipation	28		
Vomissements	26		

**Tableau 5 : Symptômes digestifs.**

## 2. *Blastocystis* sp.

### 2.1. Prévalence de *Blastocystis* sp. et distribution selon la saison

La prévalence globale de *Blastocystis* déterminée par PCR était de 18,3% (144/788, Tableau 6). Le diagnostic microscopique présentait une sensibilité de 45,8% comparativement à la PCR (tous les échantillons positifs en microscopie étaient positifs par PCR).

## RESULTATS

	Négatifs (%)	Positifs (%)	Données manquantes
<b><i>Blastocystis</i> sp. par microscopie</b>	700 (91,4)	66 (8,6)	22
<b><i>Blastocystis</i> sp. par PCR (total)</b>	644 (81,7)	144 (18,3)	0
Été	284 (76,5)	87 (23,5)	0
Hiver	360 (86,3)	57 (13,7)	0

**Tableau 6 : Prévalence de *Blastocystis* sp. (microscopie et PCR)**

La prévalence de *Blastocystis* sp. en été (23,5%) était significativement plus élevée ( $p < 0,001$ ) qu'en hiver (13,7%). L'analyse multivariée a confirmé l'effet de la saison sur la prévalence de *Blastocystis* sp. ( $p = 0,01$ ).

Les prévalences de *Blastocystis* sp. déterminées par PCR pour chaque centre sont indiquées dans le Tableau 7 et schématisés dans la Figure 1.



## RESULTATS

	Nombre	Prévalence (%)
<b>Tous centres</b>	<b>144</b>	<b>18,3</b>
Hiver	57	13,7
Eté	87	23,5
<b>Besançon</b>	<b>16</b>	<b>18,0</b>
Hiver	7	14,6
Eté	9	22,0
<b>Clermont-Ferrand</b>	<b>10</b>	<b>10,0</b>
Hiver	4	8,0
Eté	6	12,0
<b>Créteil</b>	<b>8</b>	<b>13,8</b>
Hiver	1	3,4
Eté	7	24,1
<b>Lille</b>	<b>21</b>	<b>41,2</b>
Hiver	12	40,0
Eté	9	42,9
<b>Lyon</b>	<b>15</b>	<b>18,3</b>
Hiver	7	18,4
Eté	8	18,2
<b>Montpellier</b>	<b>13</b>	<b>22,0</b>
Hiver	5	16,7
Eté	8	27,6
<b>Nantes</b>	<b>18</b>	<b>19,8</b>
Hiver	5	10,2
Eté	13	31,0
<b>Nice</b>	<b>10</b>	<b>15,9</b>
Hiver	3	9,1
Eté	7	23,3
<b>Nîmes</b>	<b>2</b>	<b>6,7</b>
Hiver	2	6,7
Eté	-	-
<b>Strasbourg</b>	<b>24</b>	<b>24,5</b>
Hiver	9	18,0
Eté	14	31,3
<b>Tours</b>	<b>7</b>	<b>10,4</b>
Hiver	2	6,7
Eté	5	13,5

Tableau 7 : Prévalence globale et centre par centre de *Blastocystis* sp. (PCR).

## RESULTATS

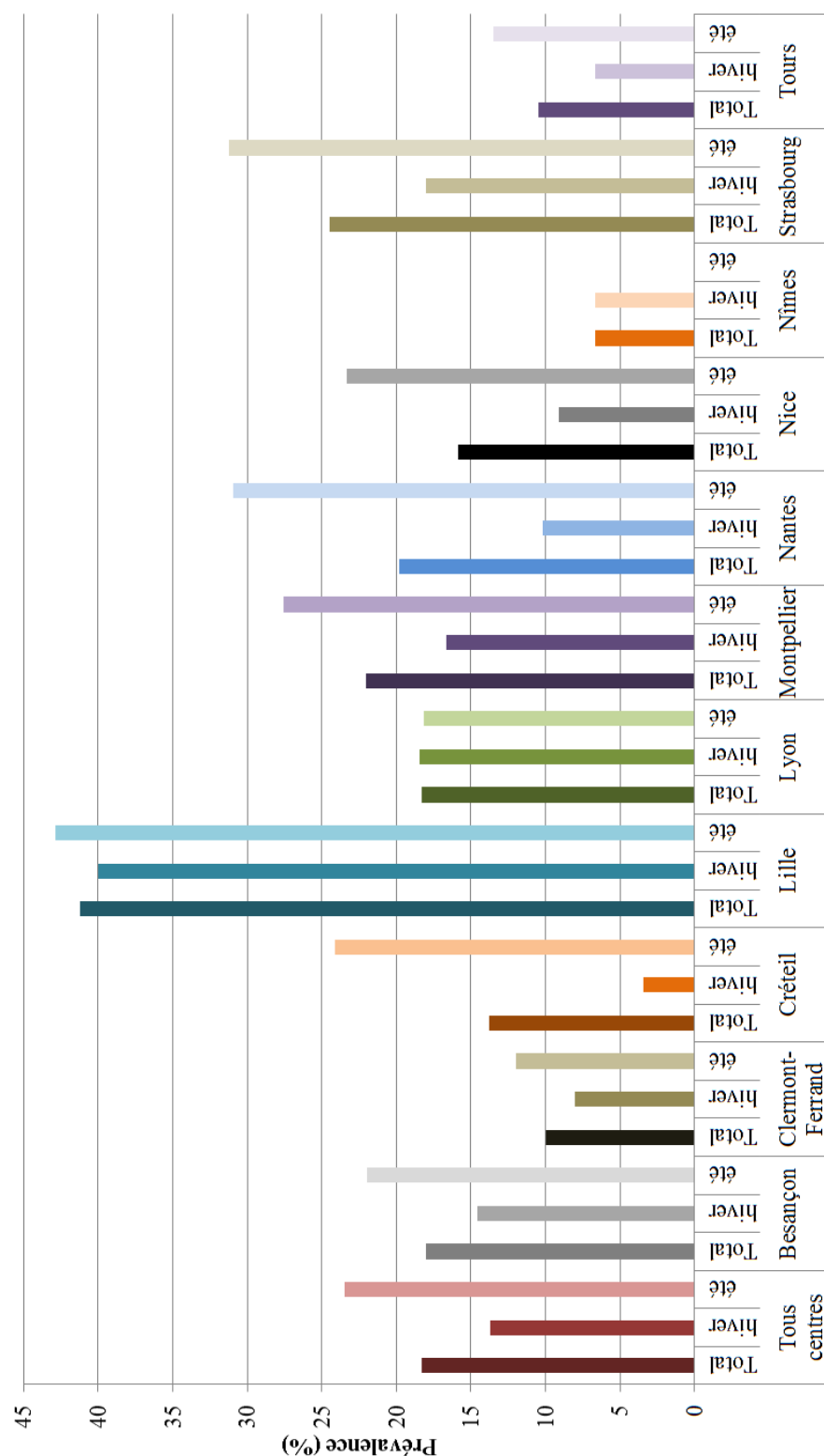


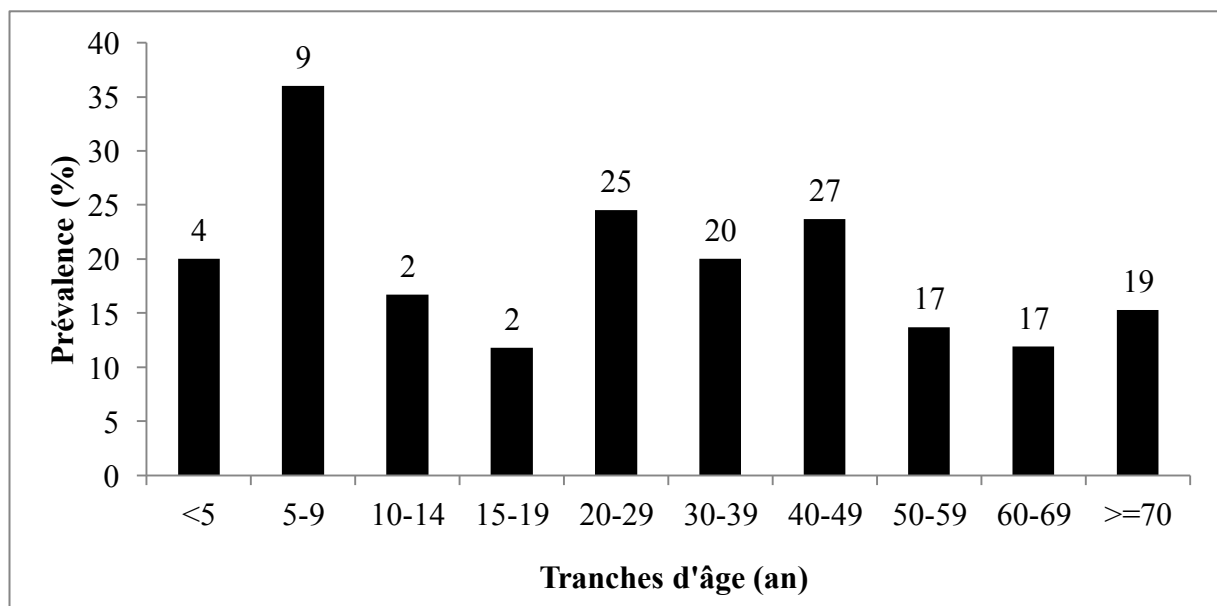
Figure 1 : Prévalence globale et centre par centre de *Blastocystis* sp. (prévalence totale, en hiver et en été).

## RESULTATS

### 2.2. Distribution de *Blastocystis* sp. selon l'âge

Les patients porteurs de *Blastocystis* sp. étaient significativement moins âgés que les patients non porteurs ( $43,0 \pm 21,1$  versus  $48,9 \pm 21,1$  ans,  $p=0,003$ ). Une analyse en sous-groupes (0 à 14 ans, 15 à 49 ans et  $>50$  ans) montre une prévalence significativement plus élevée de *Blastocystis* sp. dans le groupe d'âge allant de 15 à 49 ans (22,2%,  $p=0,01$  procédure de Marascuillo), comparativement au groupe des plus de 50 ans (18,2%). Le groupe des 0 à 14 ans présentait une prévalence supérieure (26,3%) mais non statistiquement significative probablement du fait d'un manque de puissance lié aux effectifs. Un découpage par tranches d'âges de 5 ou 10 ans montre un pic de prévalence chez les enfants entre 5 et 9 ans (Figure 2).

Le lien entre *Blastocystis* et âge n'était pas retrouvé en analyse multivariée du fait d'une interaction forte entre les variables âge et voyage (voir chapitre *Blastocystis* sp./voyage).



**Figure 2 : Prévalence de *Blastocystis* sp. selon l'âge.** Les étiquettes de données indiquent l'effectif de chaque groupe

### 2.3. Distribution de *Blastocystis* sp. selon le sexe

Nos résultats ne montrent aucune association ( $p=0,29$ ) entre la prévalence de *Blastocystis* sp. chez les femmes (16,6%) et les hommes (19,5%), quel que soit l'âge considéré.

### 2.4. Distribution de *Blastocystis* sp. selon la catégorie socio-professionnelle

## RESULTATS

---

Nous n'avons pas pu mettre en relation la prévalence de *Blastocystis* sp. avec la catégorie socio-professionnelle (étudiant, ouvrier ou équivalent, cadre ou équivalent, sans emploi, retraité) à laquelle appartenaient les patients. Les patients travaillant dans le milieu de la restauration n'étaient pas significativement plus porteurs de *Blastocystis* sp. (22,2%) que les patients exerçant d'autres professions (18,8%).

### **2.5. Distribution de *Blastocystis* sp. et la présence d'un animal de compagnie**

La prévalence de *Blastocystis* sp. chez les patients possédant un animal de compagnie n'était pas significativement supérieure aux patients n'en possédant pas (21,9% versus 19,7%,  $p=0,61$ ).

### **2.6. Relation entre *Blastocystis* sp. et voyage**

Les patients ayant voyagés récemment ( $<1$  an) présentaient une prévalence de *Blastocystis* sp. significativement plus élevée que les patients n'ayant pas voyagés (27,5% versus 14,7%,  $p<0,001$ ). L'analyse multivariée a confirmé cette association entre prévalence de *Blastocystis* sp. et voyage ( $p=0,003$ ). Nous n'avons pas pu relier la destination de ce voyage (Afrique, Asie, Amérique du Nord, Amérique du Sud, Océanie, Europe) avec un risque accru de portage du parasite. Bien que non statistiquement significatif, les patients ayant réalisés de multiples voyages au cours de la dernière année présentaient une prévalence plus élevée que les patients n'ayant voyagé qu'une seule fois (33,3% versus 25,7%,  $p=0,43$ ).

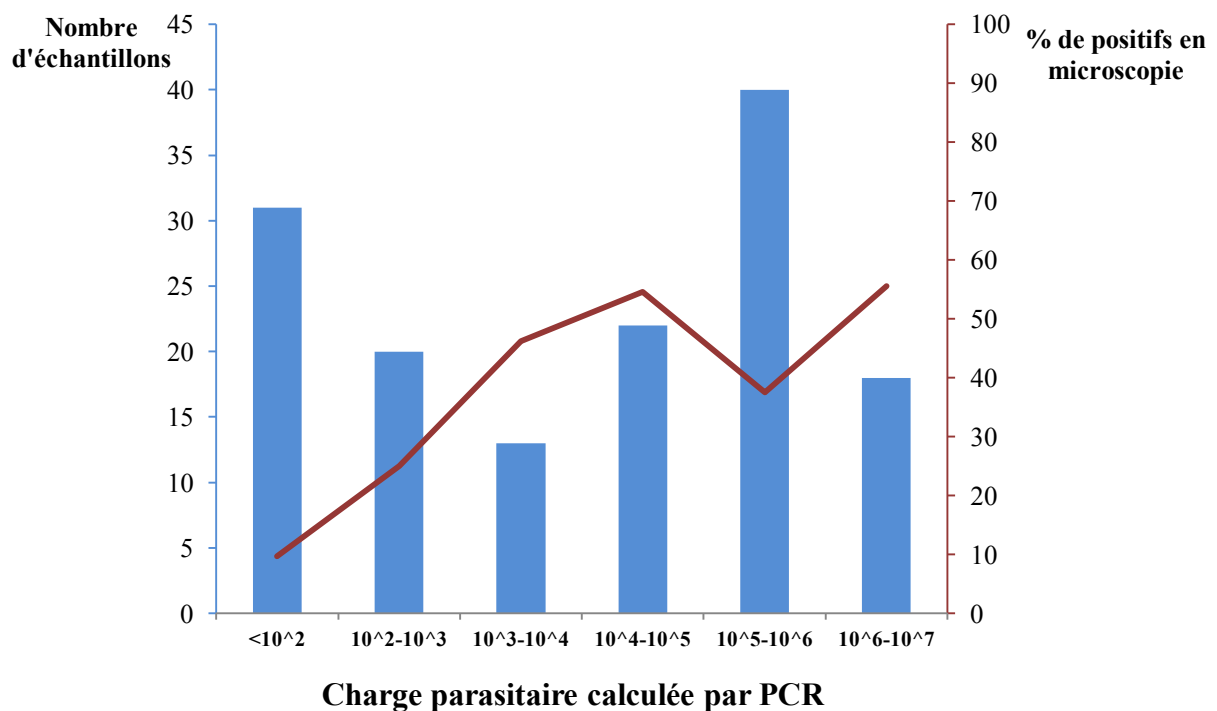
### **2.7. Charge parasitaire déterminée par PCR**

La quantité de *Blastocystis* sp. par gramme de selles a été déterminée par PCR. Cette charge parasitaire allait de moins de  $10^2$  *Blastocystis* sp./g de selles à  $>10^7$  *Blastocystis* sp./g de selles (Tableau 8). La sensibilité de la microscopie était de moins de 20% pour des charges parasitaires inférieures à  $10^3$  parasites/g de selles et atteignait plus de 50% pour des charges supérieures à  $10^7$  parasites/g de selles (Figure 3).

## RESULTATS

Charge parasitaire	$<10^2$	$10^2-10^3$	$10^3-10^4$	$10^4-10^5$	$10^5-10^6$	$10^6-10^7$
Nombre d'échantillons	31	20	13	22	40	18
Microscopie positive	3	5	6	12	15	10
Microscopie négative	28	15	7	10	25	8
Microscopie : données manquantes	0	3	1	0	0	0
% de positifs en microscopie	9,7	25,0	46,2	54,5	37,5	55,6

**Tableau 8 : Charge parasitaire et résultats de microscopie.**



**Figure 3 : Distribution de la charge parasitaire des échantillons positifs pour *Blastocystis* sp. et sensibilité de la microscopie.**

### 2.8. Distribution des sous-types (STs) de *Blastocystis* sp.

Les sous-types ST1, ST2, ST3, ST4, ST6 et ST7 ont été retrouvés lors de l'étude (Tableau 9, Figure 4). Deux infections mixtes ont été détectées.

## RESULTATS

Sous-types n(%)	ST1	ST2	ST3	ST4	ST6	ST7	Infections mixtes
<b>Tous les centres</b>	<b>28 (19,4)</b>	<b>18 (12,5)</b>	<b>61 (42,4)</b>	<b>28 (19,4)</b>	<b>3 (2,1)</b>	<b>3 (2,1)</b>	<b>2 (1,4)</b>
hiver	14 (24,1)	7 (12,1)	23 (39,7)	9 (15,5)	2 (3,4)	2 (3,4)	0 (0)
été	14 (15,9)	11 (12,5)	40 (45,5)	19 (21,6)	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (2,3)
<b>Besançon</b>	<b>1 (6,3)</b>	<b>3 (18,8)</b>	<b>5 (31,3)</b>	<b>6 (37,5)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>1 (6,3)</b>
hiver	0 (0)	2 (28,6)	3 (42,9)	2 (28,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
été	1 (11,1)	1 (11,1)	2 (22,2)	4 (44,4)	0 (0)	0 (0)	1 (11,1)
<b>Clermont-Fd</b>	<b>1 (10,0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>3 (30,0)</b>	<b>5 (50,0)</b>	<b>1 (10,0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>
hiver	1 (25)	0 (0)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
été	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	4 (66,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Créteil</b>	<b>2 (25,0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>6 (75,0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>
hiver	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
été	1 (14,3)	0 (0)	6 (85,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Lille</b>	<b>6 (28,6)</b>	<b>2 (9,5)</b>	<b>6 (28,6)</b>	<b>6 (28,6)</b>	<b>1 (4,8)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>
hiver	4 (33,3)	1 (8,3)	3 (25,0)	3 (25,0)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)
été	2 (22,2)	1 (11,1)	3 (33,3)	3 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Lyon</b>	<b>4 (26,7)</b>	<b>3 (20,0)</b>	<b>6 (40,0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>1 (6,7)</b>	<b>1 (6,7)</b>	<b>0 (0)</b>
hiver	3 (42,5)	1 (14,3)	2 (28,6)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	0 (0)
été	1 (12,5)	2 (25,0)	4 (50,0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)
<b>Montpellier</b>	<b>1 (7,7)</b>	<b>4 (30,8)</b>	<b>6 (46,2)</b>	<b>2 (15,4)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>
hiver	0 (0)	2 (40,0)	3 (60,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
été	1 (12,5)	2 (25,0)	3 (37,5)	2 (25,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Nantes</b>	<b>3 (16,7)</b>	<b>1 (5,6)</b>	<b>6 (33,3)</b>	<b>5 (27,8)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>2 (11,1)</b>	<b>1 (5,6)</b>
hiver	0 (0)	0 (0)	3 (60,0)	1 (20,0)	0 (0)	1 (20,0)	0 (0)
été	3 (23,1)	1 (7,7)	3 (23,1)	4 (30,8)	0 (0)	1 (7,7)	1 (7,7)
<b>Nice</b>	<b>0 (0)</b>	<b>2 (20,0)</b>	<b>8 (80,0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>
hiver	0 (0)	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
été	0 (0)	1 (14,3)	6 (85,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Nîmes</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>2 (100,0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>
hiver	0 (0)	0 (0)	2 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
été	/	/	/	/	/	/	/
<b>Strasbourg</b>	<b>6 (25,0)</b>	<b>3 (12,5)</b>	<b>11 (45,8)</b>	<b>3 (12,5)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>
hiver	3 (30,0)	0 (0)	4 (40,0)	2 (20,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
été	3 (21,4)	3 (21,4)	7 (50,0)	1 (7,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Tours</b>	<b>4 (57,1)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>2 (28,6)</b>	<b>1 (14,3)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>
hiver	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
été	2 (40,0)	0 (0)	2 (40,0)	1 (20,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tableau 9 : Distribution des STs de *Blastocystis* sp.**

## RESULTATS

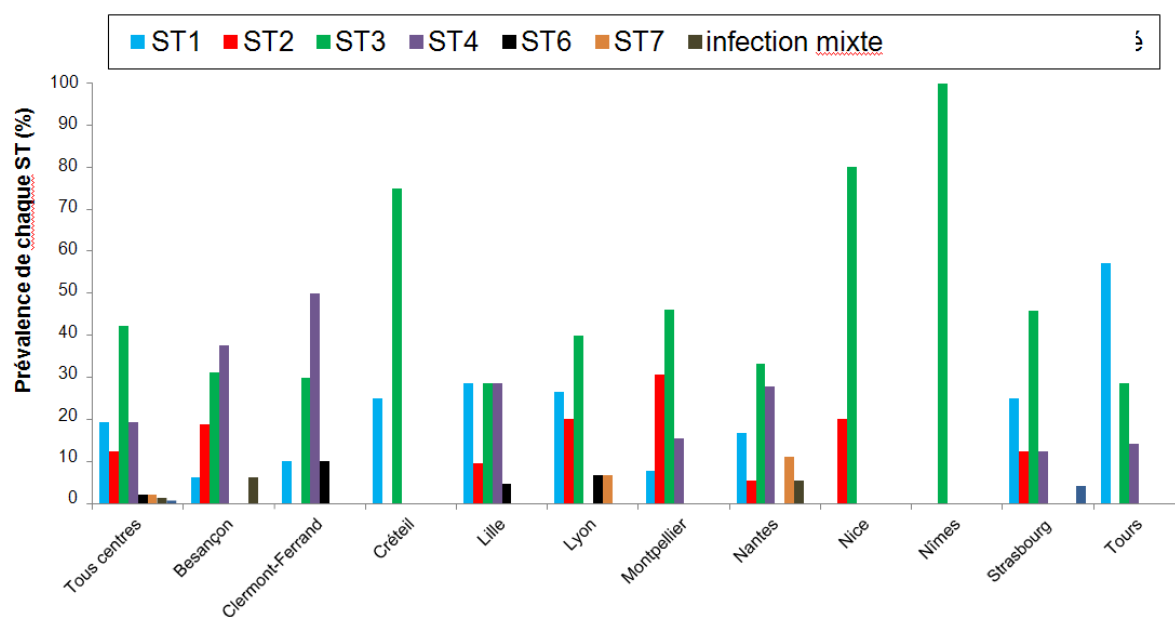


Figure 4 : Distribution des sous-types de *Blastocystis* sp.

Il n'a pas été mis en évidence de différence de distribution des STs selon la saison de recrutement (Figure 5).

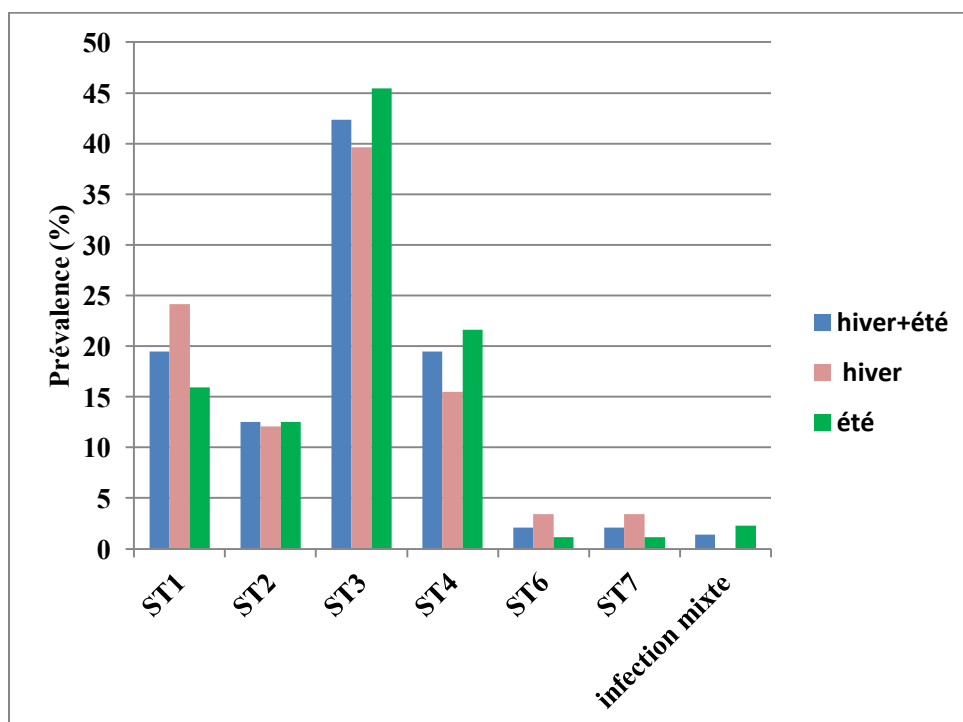
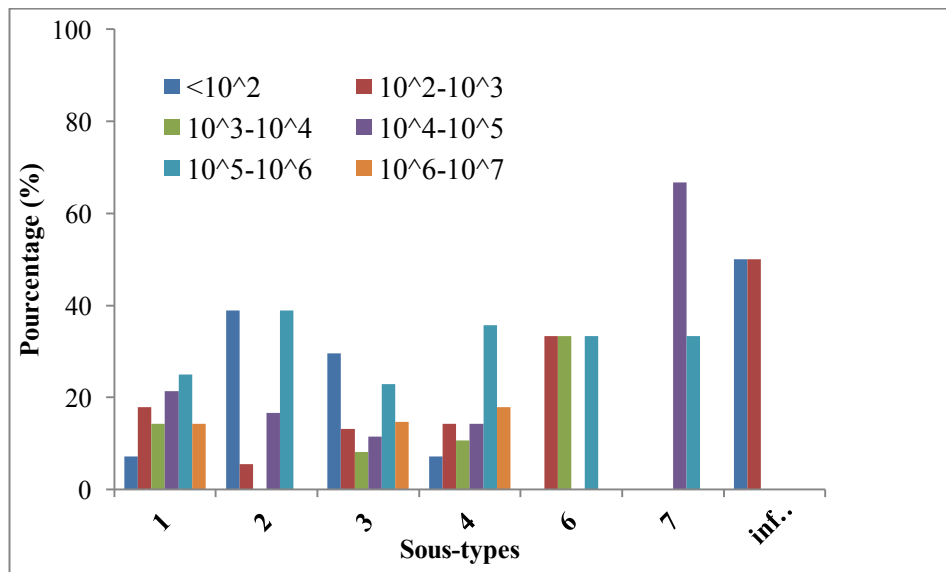


Figure 5 : Distribution des sous-types de *Blastocystis* sp. selon la saison

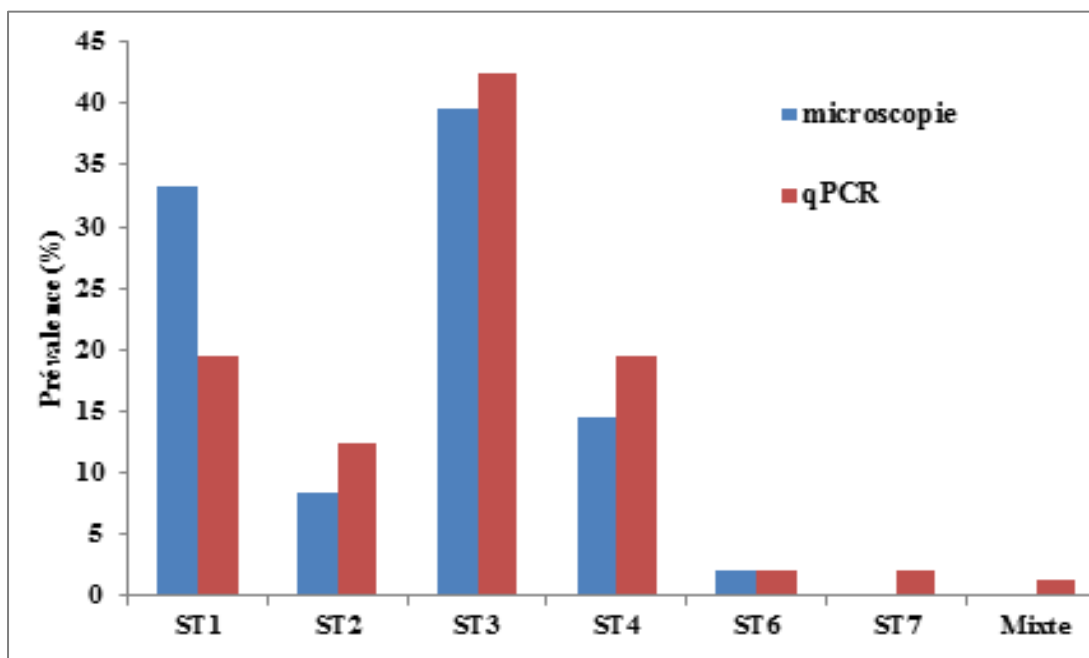
## RESULTATS

Dans notre étude, il n'y pas de relation significative entre le ST de *Blastocystis* sp. et la charge parasitaire dans les selles (Figure 6).



**Figure 6 : Relation entre sous-type et charge parasitaire**

Le diagnostic microscopique (Figure 7) semble induire une surestimation de la prévalence de ST1 (qui n'est pas liée à de plus fortes charges parasitaires du ST1, voir Figure 6).



**Figure 7 : Impact de la méthode diagnostic sur la prévalence de chaque sous-type de *Blastocystis* sp. déterminée au sein de la même population**



## RESULTATS

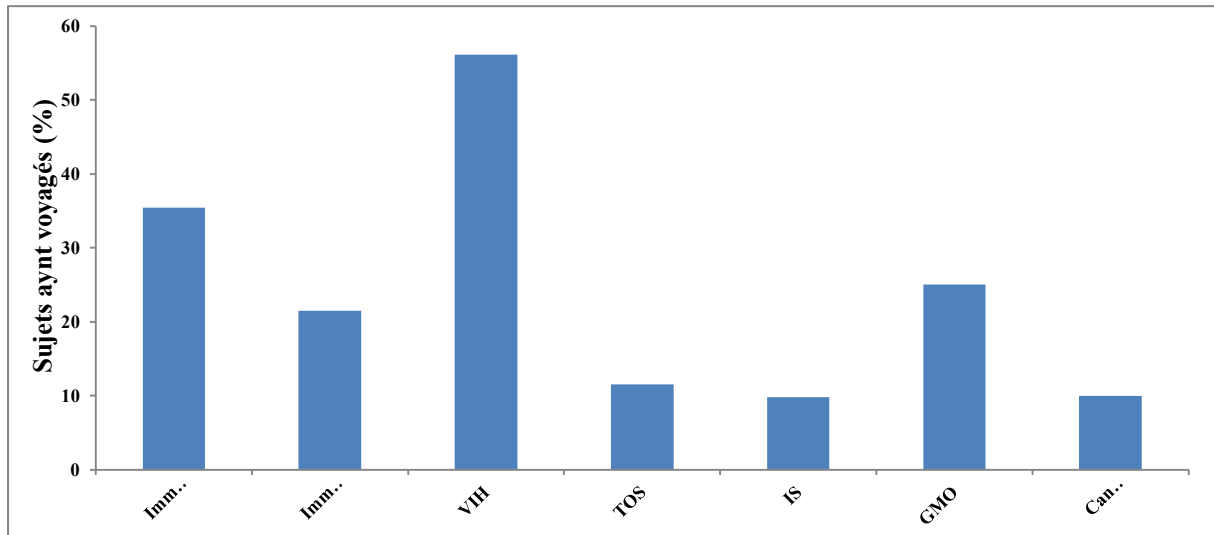
### 2.9. Relation entre la prévalence de *Blastocystis* sp. et le statut immunitaire des patients

Les patients immunodéprimés (toutes causes confondues, Tableau 10) présentaient une prévalence de *Blastocystis* sp. significativement inférieure à celle des immunocompétents ( $p < 0,001$ ). L'analyse multivariée a confirmé cette observation ( $p = 0,001$ ). L'analyse selon le type d'immunodépression montrait que ce fait restait vrai chez les patients transplantés d'organes solides, traités par immunosuppresseurs et greffés de moelle osseuse. En revanche, cette différence n'était pas significative chez les patients VIH positifs et les patients présentant un processus tumoral. Une explication à ces plus faibles prévalences pourrait être que dans notre cohorte les patients immunodéprimés ont moins voyagé que les immunocompétents, à l'exception des patients VIH (Figure 8).

	Statut	<i>Blastocystis</i> sp. – n (%)	<i>Blastocystis</i> sp. + n (%)	p value	Données manquantes
<b>Immunodéprimés (toute cause possible)</b>	oui	331 (87,6)	<b>47 (12,4)</b>	<0,001	59
	non	266 (75,8)	<b>85 (24,2)</b>		
VIH	oui	48 (82,8)	<b>10 (17,2)</b>	0,86	
	non	549 (81,8)	<b>122 (18,2)</b>		
Transplanté d'organe solide	oui	83 (87,4)	<b>12 (12,6)</b>	0,14	
	non	514 (81,1)	<b>120 (18,9)</b>		
Traitement par immunosupresseurs	oui	120 (91,6)	<b>11 (8,4)</b>	0,001	
	non	477 (79,8)	<b>121 (20,2)</b>		
Grefe de moelle osseuse	oui	60 (92,31)	<b>5 (7,7)</b>	0,02	
	non	537 (80,9)	<b>127 (19,1)</b>		
Cancer	oui	31 (91,2)	<b>3 (8,8)</b>	0,15	
	non	566 (81,4)	<b>129 (18,6)</b>		

**Tableau 10 : Prévalence de *Blastocystis* sp. chez les patients immunodéprimés**

## RESULTATS



**Figure 8 : Fréquence des voyages (<1 an) dans chaque groupe de patients.** TOS : Transplantation d'organe solide ; IS : traitement immunosuppresseur ; GMO : greffe de moelle osseuse.

### 2.10. Prévalence de *Blastocystis* sp. et maladies intestinales

La prévalence de *Blastocystis* sp. a été étudiée chez les 25 patients présentant une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) et les 15 patients souffrant du syndrome de l'intestin irritable (SII). Aucune différence significative n'a été retrouvée probablement du fait des faibles effectifs analysés (Tableau 11).

	Statut	<i>Blastocystis</i> sp. –	<i>Blastocystis</i> sp. +	p value	Données manquantes
		n (%)	n (%)		
MICI	oui	22 (88,0)	3 (12)	0,41	8
	non	616 (81,6)	139 (18,4)		
SII	oui	12 (80,0)	3 (20,0)	0,88	55
	non	585 (81,5)	133 (18,5)		

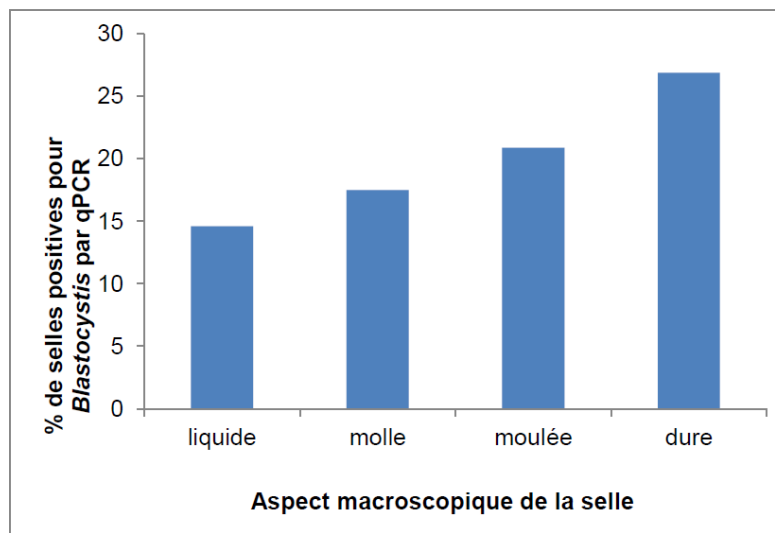
**Tableau 11 : Prévalence de *Blastocystis* sp. chez les patients MICI et SII**

### 2.11. *Blastocystis* sp. et signes cliniques

La principale limitation à cette analyse est l'absence de données bactériologiques et virales. Par ailleurs, chez les patients porteurs d'une autre parasitose intestinale, la prévalence de *Blastocystis* sp. était significativement plus élevée (40,0% versus 16,2%,  $p < 0,001$ ).

## RESULTATS

Bien que non significatif, les patients porteurs de *Blastocystis* sp. présentaient plutôt des selles dures ou moulées (Figure 9).



**Figure 9 : Prévalence de *Blastocystis* sp. selon l'aspect de la selle**

Le signe clinique digestif associé au portage de *Blastocystis* sp. était la présence de douleurs abdominales (Tableau 12). On retrouvait également une tendance à la présence de ballonnements. Les Figures 10 et 11 détaillent les valeurs de charges parasitaires ainsi que la distribution des STs associés aux douleurs abdominales et aux ballonnements.

		<i>Blastocystis</i> – n (%)	<i>Blastocystis</i> + n (%)	p value	Données manquantes
<b>Symptômes digestifs (tout confondu)</b>	oui	409 (81,5)	<b>93 (18,5)</b>	0,45	52
	non	196 (83,8)	<b>38 (16,2)</b>		
<b>Douleurs abdominales</b>	oui	181 (76,7)	<b>55 (23,3)</b>	0,007	
	non	424 (84,8)	<b>76 (15,2)</b>		
<b>Ballonnements</b>	oui	39 (73,6)	<b>14 (26,4)</b>	0,09	
	non	566 (82,9)	<b>117 (17,1)</b>		
<b>Diarrhées</b>	oui	342 (82,8)	<b>71 (17,2)</b>	0,63	
	non	263 (81,4)	<b>60 (18,6)</b>		
<b>Constipations</b>	oui	23 (82,1)	<b>5 (17,9)</b>	0,99	
	non	582 (82,2)	<b>126 (17,8)</b>		
<b>Vomissements</b>	oui	22 (84,6)	<b>4 (15,4)</b>	0,74	
	non	583 (82,1)	<b>127 (17,9)</b>		

**Tableau 12 : Signes cliniques digestifs et prévalence de *Blastocystis* sp.**

## RESULTATS

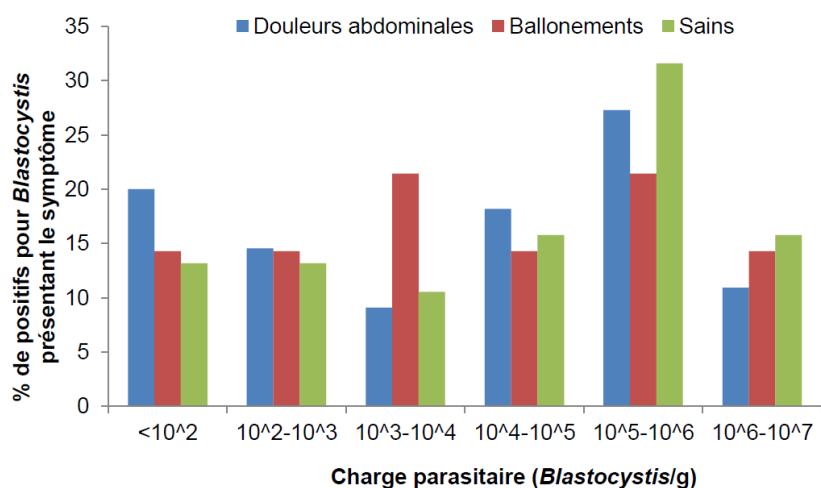


Figure 10 : Charge parasitaire et symptômes associés au portage de *Blastocystis* sp.

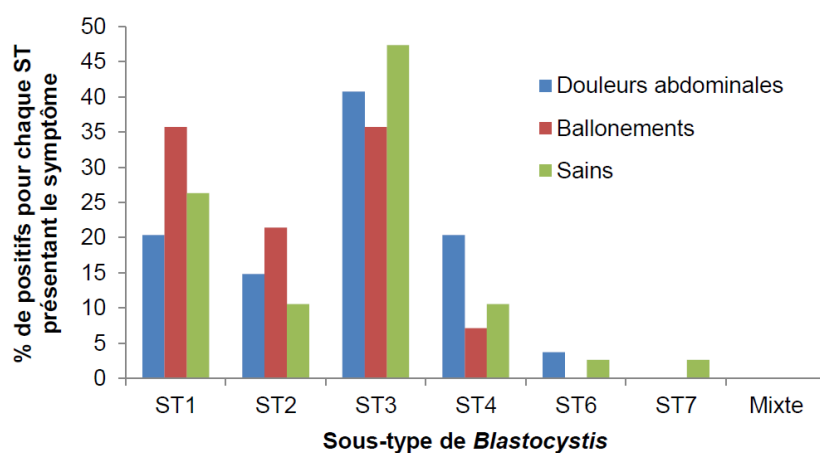


Figure 11 : Distributions des STs selon les principaux symptômes associés au portage de *Blastocystis* sp.

### I.5.3. Conclusions

Cette étude épidémiologique mettant en jeu différents centres hospitaliers est à notre connaissance la première menée à grande échelle en France visant à déterminer la prévalence et la distribution des différents STs de *Blastocystis* sp. dans la population totale. Sur 788 échantillons de selle testés, 144 se sont avérés positifs pour le parasite par PCR en temps réel soit une prévalence de 18,3% ce qui est loin d'être négligeable. Cette prévalence est plus forte en été (23,5%) qu'en hiver (13,7%) ce qui peut facilement s'expliquer par des facteurs de risque de transmission du parasite plus importants en été. Cette prévalence montre aussi des variations géographiques assez importantes puisqu'elle est de 41,2% à Lille et de 10% à Clermont-Ferrand. D'autre part, la prévalence du parasite est plus importante dans le groupe d'âge allant de 20 à 49 ans et chez les individus ayant voyagé récemment. Par contre, ce n'est pas le cas chez les patients immunodéprimés ou chez ceux atteints de différentes pathologies intestinales type MICI ou IBS. En outre, le signe clinique digestif principalement associé au portage de *Blastocystis* sp. est la présence de douleurs intestinales et à un moindre degré celle de ballonnements. De plus, en déterminant la charge parasitaire dans les selles des patients par PCR en temps réel, la faible sensibilité de la microscopie comme méthode d'identification a bien été confirmée en particulier dans le cas des selles peu chargées en parasites. Pour ce qui est de la distribution des STs, on note globalement une prédominance du ST3 suivi des ST1 et ST4 et du ST2 ce qui représente une distribution assez classique dans les pays européens. Cette distribution n'est d'ailleurs pas significativement différente selon les saisons. D'autre part, aucune corrélation claire n'est observée entre le ST et l'apparition de certains symptômes digestifs.

## II. Facteurs de risque de transmission de *Blastocystis* sp. à l'homme

### II.1. Analyse des sources de transmission animales et environnementales au Liban

**Préambule** : Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de rédaction pour soumission au journal « PLoS Neglected Diseases ».

#### II.1.1. Introduction

Dans nos précédentes enquêtes épidémiologiques menées au Liban, nous avons pu confirmer les premières données alarmantes de Monzer et al. (2004) concernant la prévalence importante des parasitoses intestinales dans ce pays. En effet, la prévalence de *Blastocystis* sp. était de 20% dans la population totale (**Par. I.1.**) tout en étant probablement largement sous-estimée puisque déterminée par une méthode d'identification par microscopie. D'ailleurs, cette prévalence atteignait ou dépassait les 60% dans des cohortes ciblées comme les patients diarrhéiques (**Par. I.2.**) ou les écoliers (**Par. I.3.**). De telles prévalences posaient logiquement la question de la circulation de ce parasite dans les populations humaine, animale et dans l'environnement. Il était donc important de pouvoir identifier les sources de contamination potentielles pour l'homme qui peuvent être d'origine hydrique et/ou zoonotique. Aussi, une nouvelle étude épidémiologique de *Blastocystis* sp. a été menée dans une région géographique limitée du Nord-Liban, le district d'Akkar, dans laquelle un nombre important d'échantillons humains, animaux et environnementaux ont été prélevés et analysés.

#### II.1.2. Matériels et méthodes

##### Descriptif et coordonnées de la région géographique choisie

Le district d'Akkar appartient au gouvernorat du Nord-Liban et représente la seconde région du pays en termes de superficie (788 km<sup>2</sup>) et de population avec environ 200 000 habitants répartis dans 216 villes et villages (**Figure 27**). Ce district se situe à une latitude (DMS) de 34° 38' 60 N et à une longitude (DMS) de 36° 2' 60 E avec un climat méditerranéen doux. Plus de 40% des habitants de ce district travaillent dans l'agriculture et dans l'élevage des animaux et surtout des bovins et des volailles.

##### Collecte des échantillons et observation microscopique des selles

## RESULTATS

---

De Septembre à Décembre 2012, 152 échantillons de selle de vaches ont été collectés dans 33 fermes localisées dans 20 villages du district d'Akkar (**Figure 28**). Le nombre d'échantillons prélevés dans chaque village variait en fonction du nombre de fermes afin d'avoir une répartition assez uniforme des prélèvements au sein du district. Ces prélèvements ont été réalisés pour des vaches laitières de l'espèce Holstein qui représente actuellement la race laitière la plus répandue au Liban mais aussi dans le monde. La collection des échantillons fécaux a été réalisée en matinée avec l'aide d'une personne prenant soin de l'animal. Les matières fécales au sol pouvant être rapidement contaminées et ainsi fausser les analyses, les échantillons ont donc été recueillis directement sur l'animal à l'aide d'un gant d'examen rectal puis transférés dans un récipient en plastique stérile portant les informations nécessaires à l'identification de l'échantillon. Pour les selles humaines, des prélèvements chez les personnes en contact avec ces animaux ne pouvaient pas être réalisées pour des raisons évidentes d'éthique. Aussi, 100 selles de patients atteints ou non de pathologies pouvant être ou non intestinales ont été collectés dans les deux seuls hôpitaux situés dans ce district (Hôpital Al-Youssef et Hôpital Rahal). Cependant, puisqu'une grande partie de la population du district élevait des bovins et était accueillie dans ces deux hôpitaux pour tout problème de santé, cette collection de selles humaines était donc pour nous à l'image de ce que nous aurions pu directement prélever sur le terrain. Tous ces échantillons de selles ont été rapidement transportés au Laboratoire de Microbiologie, Environnement et Santé du centre AZM de Tripoli afin de procéder à un examen microscopique direct des selles à l'état frais et après coloration de Ziel-Neelsen modifié avant d'être congelés. Pour chacun des patients, un consentement éclairé a été obtenu et un questionnaire standard (**Annexe 1**) a été complété indiquant plusieurs données d'intérêt dans le cadre de notre étude. Aucune information n'était disponible pour ces patients concernant la présence d'infections virales ou bactériennes. En parallèle, nous avons collecté 97 échantillons d'eau prélevés dans les 33 fermes citées ci-dessus ainsi que dans 18 autres fermes localisées dans 9 villages voisins. Pour la majorité des points de prélèvement, deux échantillonnages d'eau d'un litre dont l'une est consommée par les habitants et l'autre par les animaux ont été réalisés. Chaque prélèvement environnemental a été filtré sur une membrane de Polycarbonate Nucleopore Whatman (47 mm de diamètre, 1  $\mu$ m de taille des pores, Whatman, GE Healthcare, Life Sciences) à l'aide d'une pompe à vide. Une étape de préfiltration en utilisant une membrane de 60  $\mu$ m de porosité a été réalisée pour les échantillons d'eau étant trop troubles et donc trop chargés en matière organique et détritiques qui satureraient rapidement le filtre de faible porosité. Des contrôles négatifs (eau distillée)

## RESULTATS

---

ont été effectués avant et après chaque série de filtration des échantillons recueillis quotidiennement afin de s'assurer de l'absence de contamination accidentelle.

### Extraction d'ADN total à partir des différents échantillons et sous-typage des isolats

L'ADN total a été extrait des selles humaines et animales comme décrit précédemment (**Par. I.2.2.**). Pour ce qui est des échantillons environnementaux, les ADNs totaux ont été extraits à partir des filtres à l'aide du Power Water DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) selon les instructions du fabricant. Tous les ADNs extraits ont été stockés à -80°C avant d'être utilisés. La détection de *Blastocystis* sp. par PCR en temps réel (Poirier et al. 2011) et l'analyse des séquences obtenues en vue du sous-typage des isolats ont été réalisées comme décrit ci-dessus (**Par. I.2.2.**). Si la séquence d'un produit de PCR en temps réel présentait une similarité égale ou inférieure à 96% avec celles de STs connus, se posait alors la question de l'identification d'un nouveau ST. Les ADNs des échantillons en question étaient alors utilisés dans le cadre d'une PCR classique décrite par Scicluna et al. (2006) permettant d'amplifier un fragment plus long du gène de l'ADNr nucléaire 18S d'environ 600 pb. Les produits de cette seconde PCR étaient ensuite purifiés à l'aide du kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) puis directement séquencés ou clonés (ligation) dans le vecteur pCR2.1 du kit TOPO TA Cloning (Invitrogen®) (**Annexe 4**) selon les instructions du fabricant. Dans ce cas, les bactéries compétentes *Escherichia coli* TOP10 du même kit étaient transformées par choc thermique avec les produits de ligation. Ces bactéries étaient étalées sur milieu LB solide (1.5% d'agar) contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et du X-galactopyranoside (X-gal) (40 µg/ml) puis incubées une nuit à 37°C. Pour chaque transformation, plusieurs clones positifs (colonies blanches) étaient sélectionnés puis mis en culture dans 6 ml de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), une nuit à 37°C sous agitation. Les plasmides étaient ensuite extraits à partir de 4 ml de culture bactérienne à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). L'ADN purifié était repris dans 30 µl de tampon d'élution puis dosé au Nanodrop 2000. La présence d'un insert était vérifiée par digestion du plasmide avec l'enzyme de restriction *EcoRI* (Invitrogen) (3 µl de plasmide, 1 µl de tampon 10X de l'enzyme, 1 µl d'enzyme (10 unités) dans un volume final de 10 µl) puis ce produit de digestion était déposé et visualisé sur gel d'agarose. A partir des résultats des digestions, cinq clones positifs étaient sélectionnés arbitrairement pour chaque clonage et séquencés à l'aide d'amorces conservées localisées de part et d'autre du site de clonage du plasmide (M13 Reverse et M13 Forward).



## RESULTATS

---

### Analyse statistique

Pour explorer certaines associations, des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team 2005) en utilisant le test exact de chi-deux et le test de Fisher. La valeur  $p < 0,05$  était considérée comme statistiquement significative.

### II.1.3. Résultats

Un total de 252 échantillons de selles humaines et animales ont donc été analysés dans le cadre de cette étude afin de détecter la présence de *Blastocystis* sp. par examen microscopique direct et par PCR en temps réel. La cohorte de 100 patients suivis dans deux hôpitaux du district était composée de 61 individus de sexe masculin et de 39 de sexe féminin âgés de 4 mois à 88 ans avec un âge moyen de 11 ans et 7 mois. L'examen microscopique des selles montrait la présence de parasites intestinaux avec une prédominance de *Blastocystis* sp. (20/100 soit 20% des cas) et une faible prévalence de *Giardia intestinalis* et de *Taenia* sp. (1 seul cas recensé pour chacun de ces deux parasites). Par PCR en temps réel, 30 patients ont été diagnostiqués positifs pour *Blastocystis* sp. et seules des mono-infections furent mises en évidence chez ces individus (**Tableau 10**). Les séquences des produits d'amplification de ces 30 échantillons présentaient une très grande similarité (97% à 100%) avec les séquences d'isolats de STs connus disponibles dans les bases de données. Dans cette cohorte, le ST3 était prédominant (66,7%) suivi du ST1 (16,7%), du ST2 (10%) et du ST4 (6,6%) (**Tableau 11**). Ces 30 isolats ont été identifiés chez 25 patients symptomatiques et 5 patients asymptomatiques. Pourtant, même si la plupart des isolats de ST3 ont été identifiés chez des patients symptomatiques, aucune différence significative dans la distribution des STs de *Blastocystis* sp. entre individus symptomatiques et asymptomatiques (Test exact de Fisher,  $p=0.4992$ ) n'a pu être mis en évidence. De plus, les analyses statistiques réalisées ne montraient pas d'association significative entre l'infection à *Blastocystis* sp. et certains caractères pris en compte tels que le sexe ou l'âge des patients, la présence de symptômes, la nature de l'eau consommée ou le contact avec des animaux ( $p>0.05$ ).

Concernant l'analyse des selles de bovins, *Blastocystis* sp. a été trouvé dans 48% d'entre elles (75/152) par examen microscopique direct des selles. Par PCR en temps réel, cette prévalence grimpeait à 80% (121/153) chez ces vaches laitières. D'autre part, le parasite a été détecté dans la totalité des 33 fermes testées réparties dans 20 villages du district d'Akkar. Les séquences des isolats sous-typés présentaient de 96 à 100% d'identité avec les séquences d'isolats de STs connus disponibles dans les bases de données. Parmi les séquences obtenues,

## RESULTATS

---

17 d'entre elles présentaient ainsi une similarité de 96% avec celles publiées pour *Blastocystis* sp. ST14. Afin de savoir si ces séquences appartenaient bien au ST14 ou si elles représentaient un nouveau ST, une PCR classique amplifiant un fragment plus long de 600 pb du gène codant l'ARNr 18S nucléaire de ce parasite a été réalisée pour deux isolats représentatifs de ce groupe de 17 isolats. Les nouvelles séquences de 600 pb obtenues montraient une similarité de 98% avec celles connues d'isolats de ST14 confirmant que ces isolats de bovins appartenaient bien à ce ST. Pour 29 autres échantillons, un signal positif en PCR en temps réel a été obtenu mais les électrophorégrammes des séquences correspondantes montraient la présence d'infections mixtes avec présence de plusieurs STs de *Blastocystis* sp. Pour les 92 monoinfections identifiées chez ces bovins, la distribution des STs était la suivante (**Tableau 11**) : ST10 (44,6%), ST14 (44,6%), ST5 (5,4%), ST1 (4,3%) et ST7 (1,1%).

Enfin concernant les prélèvements d'eau consommée par les habitants et les animaux, 69 des 102 échantillons testés par PCR en temps réel étaient positifs pour *Blastocystis* sp. soit 67,7% des prélèvements. Si on excluait les 5 infections mixtes identifiées dans ces échantillons, la distribution des STs pour les 64 mono-infections restantes était la suivante : ST3 (50%), ST1 (20,3%), ST2 (15,6%), ST4 (12,5%) et ST10 (1,6%). Il est important de signaler que le seul isolat de ST10 identifié dans ces prélèvements l'avait été dans un échantillon d'eau consommé par les vaches.

### II.1.4. Conclusions

A notre connaissance, cette étude est la première du genre au Liban visant à identifier les facteurs de risque de transmission de *Blastocystis* sp. chez l'homme. Pour cela, des isolats d'animaux et des échantillons d'eau ont été sous-typés. La distribution des STs obtenus a été comparée à celle observée dans la population humaine consommant cette eau et étant en contact direct avec ces animaux. Plus généralement, c'est aussi la première étude focalisée sur la transmission du parasite et utilisant une méthode d'identification du parasite très sensible comme la PCR en temps réel. Pour ce qui est de la prévalence de *Blastocystis* sp. dans la cohorte de patients symptomatiques ou asymptomatiques de cette enquête, elle est du même ordre de grandeur que celle observée dans notre première étude menée au Liban (**Par. I.1**). Concernant l'analyse des échantillons environnementaux, les données obtenues montrent sans ambiguïté une contamination massive des sources d'eau de consommation pour les populations humaine et animale ce qui bien entendu ne peut que faciliter la transmission du

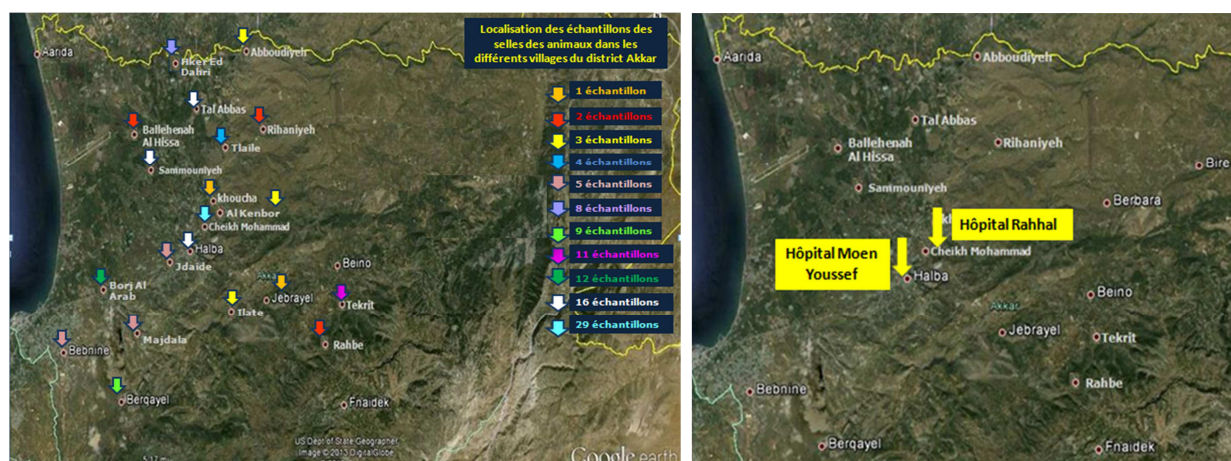
## RESULTATS

---

parasite. D'ailleurs, il est intéressant de constater que les distributions des STs des isolats humains et environnementaux sont absolument identiques avec une prédominance du ST3 suivie du ST1, du ST2 et du ST4. Cette corrélation marquée ne peut être une coïncidence et confirme un risque de transmission majeur du parasite par voie hydrique. Chez les bovins, la fréquence du parasite observée dans cette étude (80%) est l'une des plus importantes jamais décrites chez un groupe d'animaux. Il est donc évident que ce parasite pourrait avoir un impact majeur en termes de santé animale si sa pathogénicité venait à se confirmer chez les bovins. Mais un point majeur concerne l'analyse de la distribution des STs de *Blastocystis* sp. observée chez ces animaux. En effet, 5 STs ont été identifiés dans cette cohorte en l'occurrence les ST10, ST14, ST5, ST1 et ST7. Le ST1 fait bien entendu partie des 4 STs prédominants dans la population humaine mais il reste fortement minoritaire chez les bovins. Il en est de même pour les ST7 et ST5 qui ne sont d'ailleurs que rarement trouvés chez l'homme. Par contre, les ST10 et ST14 sont prédominants et représentent près de 90% des isolats caractérisés dans cette population animale. Or, malgré cette prévalence très importante, ces STs n'ont pas été détectés dans la population humaine que ce soit dans cette étude ou dans la littérature récente. Cependant le plus surprenant est qu'un seul isolat de ST10 a été détecté dans l'eau malgré le nombre important d'échantillons analysés et la concentration importante de certains d'entre eux en matières fécales de bovins. Si une forte spécificité d'hôte des ST10 et ST14 pourrait expliquer leurs absences dans la population humaine, elle ne peut pas par contre l'expliquer dans les échantillons environnementaux. On peut alors proposer une transmission des ST10 et ST14 par contact direct entre bovins et l'absence de toute forme kystique de résistance et de transmission de ces STs dans l'environnement mais ces hypothèses restent à confirmer. Quoiqu'il en soit, les bovins ne semblent pas, d'après nos données, représenter un risque majeur de transmission zoonotique pour l'homme.



**Figure 27 :** Situation géographique du district d'Akkar appartenant au gouvernorat du Nord-Liban et dont la capitale est Tripoli.



**Figure 28 :** Localisation géographique dans le district d'Akkar des villages dans lesquels des prélèvements de selles de vaches ont été réalisés et des deux hôpitaux où le recrutement des patients a eu lieu. Le nombre d'échantillons animaux prélevés dans chaque village varie en fonction du nombre de fermes.

<b>Patients</b>	<b>Sexe/Age</b>	<b>Symptômes</b>	<b>STs de <i>Blastocystis</i> sp.par PCR</b>
<b>THB1</b>	F/25	-	ST1
<b>THB2</b>	M/7	Douleurs abdominales, asthénie	ST3
<b>THB3</b>	F/22	Diarrhée	ST2
<b>THB4</b>	M/9 mois	Douleurs abdominales	ST4
<b>THB5</b>	F/56	Douleurs abdominales, ballonnements, asthénie	ST3
<b>THB6</b>	M/11 mois	Douleurs abdominales, ballonnements	ST4
<b>THB7</b>	M/16	Douleurs abdominales	ST2
<b>THB8</b>	M/2	Douleurs abdominales	ST2
<b>THB9</b>	M/74	-	ST3
<b>THB10</b>	M/10 mois	Douleurs abdominales, diarrhée	ST1
<b>THB11</b>	F/67	Douleurs abdominales, diarrhée, ballonnements, skin rash	ST1
<b>THB12</b>	F/1	Douleurs abdominales	ST3
<b>THB13</b>	F/7 mois	Douleurs abdominales	ST3
<b>THB14</b>	M/5 mois	Douleurs abdominales	ST3
<b>THB15</b>	F/6 mois	-	ST3
<b>THB16</b>	M/1	Douleurs abdominales	ST3
<b>THB17</b>	F/5	Douleurs abdominales, diarrhée	ST3
<b>THB18</b>	M/1	Douleurs abdominales, diarrhée	ST3
<b>THB19</b>	M/41	Douleurs abdominales	ST3
<b>THB20</b>	F/1	Douleurs abdominales	ST3
<b>THB21</b>	M/2	Douleurs abdominales	ST3
<b>THB22</b>	F/1	-	ST1
<b>THB23</b>	M/1	Douleurs abdominales	ST1
<b>THB24</b>	F/1	Douleurs abdominales	ST3
<b>THB25</b>	M/7 mois	Douleurs abdominales, diarrhée	ST3
<b>THB26</b>	F/5 mois	Douleurs abdominales	ST3
<b>THB27</b>	F/88	Douleurs abdominales, diarrhée	ST3
<b>THB28</b>	M/13	Diarrhée	ST3
<b>THB29</b>	M/80	-	ST3
<b>THB30</b>	M/1	Douleurs abdominales	ST3

**Tableau 10 :** Données cliniques et distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez les patients symptomatiques et asymptomatiques du district d'Akkar au Nord-Liban.

Echantillons	Positifs par microscopie	Positifs par PCR	STs de <i>Blastocystis</i> sp.								Infections mixtes	Nombre total d'échantillons analysés
			ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST7	ST10	ST14		
Eau	-	69 (68%)	13 (20,3%)	10 (15,6%)	32 (50%)	8 (12,5%)	-	-	1 (1,6%)	-	5	102
Humains	20 (20%)	30 (30%)	5 (16,7%)	3 (10%)	20 (66,7%)	2 (6,6%)	-	-	-	-	-	100
Bovins	75 (48%)	121 (80%)	4 (4,3%)	-	-	-	5 (5,4%)	1 (1,1%)	41 (44,6%)	41 (44,6%)	29	152

**Tableau 11:** Prévalence et distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans les échantillons humains, animaux et environnementaux analysés dans le district d'Akkar.

## RESULTATS

---

### II.2. Prévalence du parasite chez les animaux du zoo de La Palmyre en France

**Préambule** : Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de rédaction pour soumission au journal « PLoS One ».

#### II.2.1. Introduction

Du fait du potentiel zoonotique de *Blastocystis* sp., une meilleure connaissance de l'épidémiologie moléculaire de ce parasite chez les animaux est tout naturellement un élément clef pour contrôler et limiter sa transmission à l'homme. Pourtant, à notre connaissance, aucune donnée concernant la prévalence de *Blastocystis* sp. chez les animaux qu'ils soient sauvages ou en captivité n'avait encore été publiée en France. Or, plusieurs études menées en particulier en Australie (Parker et al. 2007, 2010) et au Danemark (Stensvold et al. 2009a) ont montré par exemple que les gardiens de zoos présentaient des risques accrus d'infection par *Blastocystis* sp. du fait de leur contact direct avec des animaux. Aussi, l'objectif de la présente étude était d'acquérir les premières données concernant la prévalence et la distribution des STs chez un nombre important d'animaux hébergés dans un grand parc zoologique français. Cette enquête pourrait ainsi permettre d'identifier les réservoirs animaux de contamination potentielle pour l'homme tout en élargissant nos connaissances sur l'épidémiologie moléculaire de ce parasite chez les animaux.

#### II.2.2. Matériels et méthodes

##### Description du parc zoologique

Une mission à laquelle j'ai participé a été réalisée par l'équipe BDPEE au zoo de La Palmyre, deuxième parc zoologique d'Europe du 15 au 18 avril 2013. Ce parc se situe dans l'Ouest de la France dans le département de la Charente-Maritime à environ 15 km de Royan et à proximité de La Rochelle. Il s'étend sur 18 hectares de forêt et reçoit près de 700 000 visiteurs par an qui ont l'opportunité d'observer plus de 1600 animaux appartenant à 130 espèces et répartis en enclos ou zones tout au long d'un parcours de plus de 4 kilomètres (**Figure 29**).

##### Collecte des échantillons, extraction d'ADN et sous-typage des isolats



## RESULTATS

---

Dans le cadre de cette mission, 210 échantillons de selles ont été collectés pour 96 espèces animales différentes appartenant à différents groupes taxonomiques. Le nombre d'échantillons et les espèces analysées se répartissaient de la manière suivante :

### Classe des Mammalia

- Ordre des Primata 30 espèces et 56 échantillons
- Ordre des Cetartiodactyla 12 espèces et 37 échantillons
- Ordre des Perissodactyla 5 espèces et 9 échantillons
- Ordre des Carnivora 16 espèces et 46 échantillons

Classe des Aves (oiseaux) 23 espèces et 43 échantillons

Groupe « Autres animaux »\* au moins 10 espèces et 19 échantillons

\* ce dernier groupe englobe plusieurs ordres : Chiroptera, Diprotodontia, Proboscidea, Rodentia, Squamata, Testudines et Crocodilia

Les prélèvements de selles dans des pots stériles étaient organisés par zone ou enclos et réalisés tôt le matin avant l'ouverture du zoo au public. Pour la majorité des espèces, plusieurs prélèvements ont été réalisés. Des échantillons correspondaient à des prélèvements à partir de groupes d'individus de la même espèce (mélanges de selles) et d'autres plus rares ont pu être obtenus à partir d'un seul individu (selles individualisées). Toutes les données (nom familier et scientifique des animaux prélevés, classification, nombre et nature des échantillons récoltés pour chaque espèce) ont été enregistrées et sont reprises en détails dans les **Annexes 5 à 9**. Les selles collectées ont ensuite été maintenues au froid jusqu'à leur arrivée à Lille où elles ont été congelées avant leur utilisation. L'extraction d'ADN total à partir de ces selles animales et le sous-typage des isolats par PCR en temps réel ont été réalisés comme décrit précédemment (**Par. I.2.2.**). Si la séquence d'un produit de PCR en temps réel venait à présenter une similarité égale ou inférieure à 96% avec celles de STs connus, la procédure expérimentale décrite précédemment (PCR classique suivie d'un clonage du produit de PCR et du séquençage de 5 clones) en vue de tester l'hypothèse de l'identification d'un nouveau ST a été suivie (**Par. II.1.2.**).



## RESULTATS

---

### II.2.3. Résultats

Au total, 83 des 210 échantillons de selles (39,5%) et 43 des 96 espèces (44,8%) testés se sont avérés positifs pour *Blastocystis* sp. par PCR en temps réel (**Tableaux 12 et 13**). Cependant, cette prévalence montrait de fortes variations d'un groupe d'animaux à l'autre. En effet, 35 des 56 (62,5%) échantillons et 17 des 30 espèces (56,7%) de primates étaient positifs pour le parasite. Il en était de même pour 21 des 37 (56,7%) échantillons et 8 des 12 espèces (66,7%) de Cetartiodactyla, 5 des 9 échantillons (55,5%) et 3 des 5 espèces (60%) de Perissodactyla, 4 des 46 échantillons (8,6%) et 4 des 16 espèces (25%) de Carnivora, 7 des 43 échantillons (16,3%) et 5 des 23 espèces (21,7%) d'oiseaux et enfin 11 des 19 échantillons (57,9%) et 6 des 10 espèces (60%) englobées dans le groupe « Autres animaux ».

Après séquençage des produits de PCR en temps réel, les séquences obtenues présentaient sauf deux exceptions discutées ci-dessous de 97 à 100% de similarité avec celles de STs connus. En analysant la distribution des différents STs chez les primates et après exclusion des 3 infections mixtes identifiées, on notait globalement une prédominance du ST1 (37,1%) suivi des ST2 et ST5 (20% chacun), du ST3 (8,6%) et du ST4 (5,7%). Chez les Cetartiodactyla et après exclusion des 6 infections mixtes identifiées, seul le ST10 a été retrouvé chez les *Bovidae* (Oryx, Koudou, Bongo, chèvre) alors que le ST14 n'a été identifié que chez la girafe. Chez les Perissodactyla et après exclusion d'un unique cas d'infection mixte, seul le ST3 a été identifié chez le tapir, le zèbre et le baudet. Chez les oiseaux, en plus de deux infections mixtes, le ST1 a été identifié chez le Flamant de Cuba, le ST4 chez le Nandou et le ST5 chez les autruches. Chez les carnivores, le ST1 a été trouvé chez l'otarie, le ST2 chez le guépard et le ST3 chez l'ours polaire et le loup de Mackenzie. Enfin, après exclusion des 6 cas d'infections mixtes identifiés dans le groupe « Autres animaux », le ST1 a été trouvé chez l'éléphant d'Asie, le ST2 chez le Capybara, le ST3 chez une roussette, le ST9 chez une tortue et le ST10 chez le kangourou.

Comme mentionné ci-dessus, deux séquences obtenues présentaient 96% ou moins de 96% de similarité avec des séquences homologues de STs connus. C'était le cas de la séquence d'un isolat de *Blastocystis* sp. identifié chez l'éléphant d'Asie qui montrait une similarité de 95% avec celles d'isolats de ST1 et de celle d'un isolat de tortue qui présentait 96% d'identité avec celles d'isolats de ST9. Une PCR classique selon le protocole de Scicluna et al. (2006) nous a permis d'amplifier un fragment plus long du gène de l'ARNr 18S à partir de l'ADN extrait des selles de la tortue, de le cloner, de séquencer plusieurs clones et de confirmer l'appartenance de l'isolat correspondant au ST9 (97% de similarité). Par contre,

## RESULTATS

---

aucune amplification n'a pu être obtenue à partir de l'ADN extrait des selles de l'éléphant ce qui pourrait s'expliquer par une sensibilité insuffisante de la PCR classique et un nombre sans doute trop faible de parasites dans les selles de cet animal. Nous avons donc pour l'instant considéré que cet isolat appartenait au ST1.

### II.2.4. Conclusions

A partir de cette toute première étude épidémiologique menée en France sur un grand nombre d'espèces animales, plusieurs considérations majeures peuvent être tirées de nos résultats. La première concerne bien entendu la forte prévalence globale de *Blastocystis* sp. dans ce zoo puisque près de 40% des échantillons et 45% des espèces testés sont porteurs du parasite. De ce fait, l'impact réel de cette contamination en termes de santé animale reste encore à évaluer. La seconde porte sur les variations de prévalence de *Blastocystis* sp. observées entre groupes d'animaux. En effet, même si le nombre d'échantillons collectés pour chacun de ces groupes est très variable, *Blastocystis* sp. montre une forte prévalence chez les primates (62,5% des échantillons) et les Cetartiodactyla (56,7%) alors que celle-ci est globalement beaucoup plus faible chez les oiseaux (16,3%) et les carnivores (8,6%). La signification de ces variations peut être liée à des différences de sensibilité à l'infection de ces différents hôtes ou à des facteurs de risque de transmission environnementaux plus ou moins importants selon les groupes d'animaux. Enfin la troisième a pour objet la distribution des différents STs dans ces groupes d'animaux et les facteurs de risque de transmission à l'homme par voie zoonotique. Globalement, les STs 1 à 4 représentent plus de 80% des isolats identifiés chez les singes. Or ces 4 STs composent aussi plus de 90% des isolats génotypés chez l'homme. Cette corrélation indique donc clairement que la transmission de ces STs peut naturellement se faire par contact entre les singes et l'homme. Cependant, la transmission inverse entre l'homme et l'animal est sans nul doute possible si on se base sur la faible spécificité d'hôte de ces STs. Chez les oiseaux, dans la majorité des études publiées jusqu'à présent, on observe une prédominance des ST6 et ST7 qui sont généralement considérés comme des STs aviaires. Or, seules 5 espèces d'oiseaux du zoo de La Palmyre se sont avérées infectées et seuls les ST1, ST4 et ST5 ont été identifiés chez ces animaux. A notre connaissance, c'est d'ailleurs la première fois que le ST5 est identifié chez les oiseaux (autruche). Les STs aviaires n'ayant pas été détectés dans notre étude, il est donc probable que les infections observées chez les oiseaux par ces 3 STs soient plutôt transitoires et opportunistes et liées à un contact proche avec des selles humaines ou animales ou à la

## RESULTATS

---

consommation d'eau ou de nourriture contaminées par le parasite. Aussi, le risque de transmission du parasite des oiseaux à l'homme reste a priori très faible. Concernant les carnivores, seules 4 espèces de carnivores testées sont positives pour ce parasite en l'occurrence le Guépard, l'Otarie, l'Ours polaire et le Loup de Mackenzie. C'est d'ailleurs la première fois que *Blastocystis* sp. est identifié chez ces espèces animales et les isolats caractérisés appartiennent aux ST1, ST2 et ST3. Les STs identifiés chez les carnivores comme d'ailleurs chez les Perissodactyles (ST3) ne présentent donc pas de spécificité d'hôte et sont les mêmes que ceux qui sont prédominants chez l'homme. Comme pour les oiseaux, on peut de nouveau proposer que les infections observées chez ces deux derniers groupes d'animaux sont les résultats de contaminations ponctuelles par l'homme, par d'autres animaux ou par de l'eau ou des aliments contaminés et que le risque de transmission du parasite des carnivores et des Perissodactyles à l'homme reste là encore très faible. C'est aussi le cas pour les Cetartiodactyla puisque seuls les ST10 et ST14 qui sont, rappelons le, absents chez l'homme, ont été retrouvés. Cela confirme aussi nos données précédentes observées dans une population de bovins au Liban (**Par. II.1.4.**). Enfin, pour ce qui est des représentants du groupe « Autres animaux » des conclusions similaires peuvent être tirées concernant un risque de transmission négligeable à l'homme.



**Figure 29:** Plan du zoo de La Palmyre et description et localisation des différents groupes d'animaux hébergés.

N° échantillons analysés dont Positifs à <i>Blastocystis</i> (%)			N° échantillons analysés	Positifs à <i>Blastocystis</i>	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST11	ST12	ST13	ST14	ST15	ST16	ST17	Infection Mixte
<b>CLASSE MAMMALIA</b> 148 échantillons analysés dont 65 positifs à <i>Blastocystis</i> (43,9%)	ORDRE	PRIMATES	56	35 (62,5%)	37,1%	20%	8,60%	5,70%	20%													8,60%
	Famille	Hominidae	12	9	1	2	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cebidae	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hylobatidae	3	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Lemuridae	10	9	2	3	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		Cercopithecidae	13	11	5	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
		Callitrichidae	15	4	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ORDRE	CERTADIODACTYLA	37	21 (56,7%)										52,40%				19%				28,60%
	Famille	Hippopotamidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Giraffidae	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	1
		Camelidae	5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Bovidae	25	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	1	-	-	-	5
	ORDRE	PERISSODACTYLA	9	5 (55,5%)			80%															20%
	Famille	Equidae	6	3	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		Rhinocerotidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tapiridae	2	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ORDRE	CARNIVORA	46	4 (8,6%)	25%	25%	50%															
	Famille	Canidae	14	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Felidae	15	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ursidae	3	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Herpestidae	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ailuridae	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Mustelidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Otariidae	6	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Procyonidae	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tableau 12 :** Récapitulatif indiquant le nombre d'isolats positifs et la distribution des STs dans la classe des Mammalia incluant les ordres des Primates, Cetartiodactyla, Perissodactyla et Carnivora

N° échantillons analysés dont Positifs à <i>Blastocystis</i> (%)			N° échantillons analysés	Positifs à <i>Blastocystis</i>	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST11	ST12	ST13	ST14	ST15	ST16	ST17	Infection Mixte
<b>CLASSE AVES</b> 43 échantillons analysés dont 7 positifs à <i>Blastocystis</i> (16,3%)	Famille	Psittacidae	11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		Phasianidae	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		Phoenicopteridae	9	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Threskiornithidae	4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Accipitridae	3	0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Anatidae			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ciconiidae				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cathartidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Columbidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Bucconidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Bucerotidae	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Struthionidae	2	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Rheidae	3	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		Sturnidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Gruidae	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Sphniscidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AUTRES ANIMAUX</b> 19 échantillons analysés dont 11 positifs à <i>Blastocystis</i>	Famille	Pteropodidae	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Macropodidae	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
		Elephantidae	4	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
		Caviidae	3	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		Iguanidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Boidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Testudinidae	6	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2
		Crocodylidae	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tableau 13 :** Récapitulatif indiquant le nombre d'isolats positifs et la distribution des STs dans la classe des Aves et dans le groupe « Autres animaux ».

## RESULTATS

---

### II.3. Prévalence du parasite dans une population de chiens en France

**Préambule** : Cette étude fait l'objet d'une publication en cours de rédaction pour soumission au journal « Veterinary Parasitology ».

#### II.2.1. Introduction

Comme suggéré dans l'étude précédente réalisée au zoo de La Palmyre (**Par.II.2.4.**), le risque de transmission de *Blastocystis* sp. à l'homme par voie zoonotique semble à l'exception des singes globalement assez faible à partir de la plupart des groupes d'animaux. Ce serait ainsi le cas du groupe des carnivores qui pourtant englobe la plupart des animaux de compagnie comme les chiens. Cependant, très peu d'études épidémiologiques visant à déterminer la prévalence du parasite dans la population canine ont été réalisées. Aussi, en collaboration avec l'Ecole Vétérinaire de Lyon, nous avons mené ce qui est à notre connaissance la première étude en France visant à déterminer la prévalence de *Blastocystis* sp. dans une population de chiens et à clarifier le potentiel de transmission zoonotique du parasite de ces animaux à l'homme.

#### II.2.2. Matériels et méthodes

##### Population animale étudiée et questionnaire

Dans cette étude, les selles de 116 chiens de différentes races, âgés de 6 semaines à 10 ans et demi et pour certains présentant des diarrhées ont été collectées par nos collègues de l'Ecole Vétérinaire Vet-Agro-Sup de Lyon. Ces chiens étaient ceux des étudiants et des personnels de l'Ecole souhaitant participer à cette étude ou ceux de particuliers suivis pour différentes pathologies par des vétérinaires étant en contact avec l'Ecole. Les analyses coprologiques standards ont été réalisées par nos collègues de l'Ecole Vétérinaire. Un tableau reprenant l'âge, le sexe, la race, les résultats de coprologie, les symptômes et les traitements éventuels pour chaque chien de cette population est présenté en **Annexe 10**.

##### Extraction d'ADN total à partir selles et sous-typage des isolats

Les ADNs totaux ont été extraits des selles fraîches à Lyon comme décrit précédemment (**Par. I.2.2.**) puis congelés avant d'être envoyés à Lille et utilisés. La détection



## RESULTATS

---

de *Blastocystis* sp. et l'analyse des séquences obtenues en vue du sous-typage des isolats ont été réalisées à Lille comme décrit ci-dessus (**Par. I.2.2.**).

### II.2.3. Résultats

Parmi les 116 échantillons testés, seuls 4 d'entre eux se sont avérés positifs pour *Blastocystis* sp. par PCR en temps réel soit environ 3,5% de la population analysée ce qui représente une prévalence extrêmement faible. Les 4 chiens positifs pour le parasite sont les suivants : une femelle Yorkshire de 4 ans sans diarrhée et sans aucun autre parasite (chien n° 12-800) ; une femelle Cocker Anglais de 10 semaines sans diarrhée mais positive pour *G. intestinalis* (n° 12-802) ; un mâle de 8 ans issu d'un croisement entre un Berger Allemand et un Berger des Pyrénées sans diarrhée et sans aucun autre parasite (n° 12-944) ; et un mâle Basset Hound de 8 mois avec diarrhée et positif pour *G. intestinalis* (n° 13-128). L'analyse des séquences obtenues a confirmé l'identification de *Blastocystis* sp. puisque les 4 séquences obtenues présentaient 99% de similarité avec des séquences de STs connus du parasite. Ainsi deux chiens étaient infectés par des isolats de ST2 (chiens 12-944 et 13-128) alors que les deux autres étaient porteurs de *Blastocystis* sp. ST10 (chiens 12-800 et 12-802). Comme indiqué dans l'**Annexe 10**, ces chiens étaient de races différentes, avaient des âges variables (de 10 semaines à 8 ans) et la répartition mâles/femelles était égale. De plus, seul le chien 13-128 porteur de *Blastocystis* sp. ST2 était diarrhéique, les 3 autres chiens positifs étant asymptomatiques. Cependant, comme indiqué ci-dessus, le chien 13-128, en plus d'être infecté par *Blastocystis* sp. ST2, était aussi porteur du parasite *G. intestinalis*. Le chien 12-802 était lui aussi infecté par *Giardia* mais ne présentait pas de troubles digestifs.

### II.2.4. Conclusions

Dans le cadre de la première étude épidémiologique portant sur la prévalence de *Blastocystis* sp. chez les chiens en France, nous avons montré que celle-ci est faible puisque de l'ordre de 3,5%. Deux STs ont été identifiés chez les chiens étudiés en l'occurrence les ST2 et ST10. Le ST2 est fréquent chez l'homme comme chez de nombreux hôtes comme nous avons pu le montrer dans nos études précédentes alors que le ST10 n'a pour l'instant été trouvé que chez les bovins. On ne retrouve donc pas de ST spécifique de ce groupe d'animaux. Ces données suggèrent donc que le chien ne serait pas un hôte naturel de *Blastocystis* sp. et que cet animal s'infecterait occasionnellement par contact avec des selles



## RESULTATS

---

humaines ou animales ou par consommation d'eau ou de nourriture contaminées par le parasite. De ce fait, l'hypothèse la plus probable est que le chien comme animal de compagnie n'est pas un facteur majeur de transmission du parasite pour l'homme. Enfin, la question de la pathogénicité de *Blastocystis* sp. chez les chiens reste à ce jour sans réponse faute de données cliniques et épidémiologiques suffisantes. Sur les 4 chiens infectés dans notre étude, un seul présentait des diarrhées qui pouvaient être liées à une infection par ce parasite. Or ce chien diarrhéique était aussi infecté par *Giardia*, un autre parasite intestinal bien connu et potentiellement responsable de troubles digestifs. De ce fait, nous ne pouvons pas, d'après nos données, répondre à cette interrogation.

## III. Pathogénicité de *Blastocystis* sp.

### III.1. Etude d'un cas clinique d'appendicite

**Préambule** : Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal « Emerging Infectious Diseases ».

#### III.1.1. Introduction

Un faisceau récent de données épidémiologiques, cliniques et génomiques couplées à des données obtenues *in vitro* et *in vivo* ont permis de supporter l'hypothèse de la pathogénicité de *Blastocystis* sp. qui est pourtant longtemps restée incertaine. Ainsi, l'association entre troubles digestifs ou urticaire et une infection par ce parasite a été confirmée. Cependant, le caractère invasif du parasite et son association avec d'autres pathologies restent encore à clarifier. Aussi, dans cette étude, nous avons mis en évidence chez une enfant de 9 ans une infection par *Blastocystis* sp. associée à une appendicite purulente et une péritonite.

#### III.1.2. Résultats

Fréalles E\*, **El Safadi D\***, Cian A, Aubry E, Certad G, Osman M, Wacrenier A, Dutoit E, Creusy C, Dubos F, Viscogliosi E (2014). *Blastocystis* infection in Casablanca (Morocco) resulting in gastroenteritis and suppurative appendicitis with peritonitis in a 9-year-old child. Emerging Infectious Disease, sous presse.

\* **Co-premiers auteurs**

#### III.1.3. Conclusions

L'étude de ce cas clinique nous a d'abord permis de confirmer le potentiel invasif et inflammatoire de *Blastocystis* sp. et son pouvoir pathogène. En effet, même si la cause majeure de l'appendicite observée chez la patiente est très probablement liée à une obstruction mécanique, la dissémination du parasite est clairement associée à un processus inflammatoire d'autant plus qu'aucun autre agent infectieux n'a pu être identifié. De plus, la présence de *Blastocystis* sp. a été révélée dans la lumière et la lamina propria de l'appendice. Un

## RESULTATS

---

traitement à base de tinidazole a d'ailleurs entraîné la totale disparition à la fois des symptômes gastro-intestinaux et du parasite dans les selles. En outre, 26 autres membres de la famille de la patiente ont souffert de diarrhée pouvant être sévère et de vomissements ce qui suggère fortement une épidémie de blastocystose dont l'origine serait une eau contaminée par le parasite.

***Blastocystis* infection in Casablanca (Morocco) resulting in gastroenteritis and suppurative appendicitis with peritonitis in a 9-year-old child**

**Emilie Fréalle\*, Dima El Safadi\*, Amandine Cian, Estelle Aubry, Gabriela Certad, Marwan Osman, Agnès Wacrenier, Emmanuel Dutoit, Colette Creusy, François Dubos, Eric Viscogliosi.**

\* These authors contributed equally to this article

**Author affiliations:** Lille University Hospital Center & Faculty of Medicine of Lille, Univ. Lille Nord de France, France (E. Fréalle, E. Aubry, A. Wacrenier, E. Dutoit, F. Dubos); Pasteur Institute of Lille, Center of Infection and Immunity of Lille (CIIL), INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Univ. Lille Nord de France, France (E. Fréalle, D. El Safadi, A. Cian, G. Certad, M. Osman, E. Viscogliosi); AZM Centre for Research in Biotechnology and its Application, Doctoral School, Lebanese University, Tripoli, Lebanon (D. El Safadi, M. Osman); Hospital Group of the Catholic Institute of Lille (GHICL), France (C. Creusy).

**Running title (45 characters):** *Blastocystis* appendicitis in Casablanca (Morocco)

**Address for correspondence:** Dr Emilie Fréalle, Pasteur Institute of Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Inserm U1019, CNRS UMR 8204, University Lille-Nord de France, Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens, 1 rue du Pr Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France; Tel: +33 3 20 87 71 56, Fax: +33 3 20 87 78 88; email: emilie.frealle@pasteur-lille.fr

**Abstract (50 words)**

Despite increasing reports of *Blastocystis* association with digestive symptoms, its pathogenicity remains controversial. We report a case of appendicular peritonitis in a 9-year-old girl returning from Morocco. Only *Blastocystis* was detected in stools, appendix, peritoneal liquid, and Douglas pouch. Simultaneous gastroenteritis in 26 members of the child's family suggested outbreak.

**Text (1 195 words)**

*Blastocystis* is a ubiquitous anaerobic protozoan parasite infecting humans and a vast range of animal species. Prevalence in humans varies from 0.5-24% in developed countries to 30-76% in developing countries (1, 2). Classical clinical features include gastro-intestinal symptoms such as nausea, anorexia, flatulence, acute or chronic diarrhea. Fever is usually absent. An association with irritable bowel syndrome and extra-intestinal manifestations such as urticaria has been suggested (2). Reports about invasive infection or disseminated diseases are rare (3). Here, we report the case of a pediatric patient infected with *Blastocystis* who presented with gastroenteritis associated with suppurative appendicitis and peritonitis.

In August 2013, a 9-year-old girl returning from a 1-month stay with her family in Casablanca, Morocco, was admitted to Lille University Hospital. Symptoms started in Casablanca 3 days before hospital admission and included fever, severe diarrhea (>10 stools/day), vomiting, abdominal pain in the hypogastric area and in the right and left lower quadrants associated with bilateral dorsal pain, anorexia and weakness. Blood count showed 13,850/mm<sup>3</sup> white blood cells (75.4% neutrophils, 15.9% lymphocytes and 8.5% monocytes). C-Reactive Protein was increased at 266 mg/l. A traveler's gastroenteritis was diagnosed and a symptomatic treatment with paracetamol, phloroglucinol and racecadotril was prescribed. However, increase in abdominal pain and total food intolerance occurred in the following hours. An abdominal echography was performed, revealing appendicitis with suppuration in the Douglas Pouch and the reflex ileus. Parasitological examination of stools revealed only abundant *Blastocystis* vacuolar forms, with more than 5 parasites per field. Absence of *Cryptosporidium* was further confirmed by glycerin method and real-time PCR. Yeasts and a multi-microbial flora were present in the stools but other infectious agents such as *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus and Rotavirus were not detected. Similarly, multi-microbial flora but no pathogenic bacteria were detected in the peritoneal liquid and Douglas Pouch (Table 1). Histopathological observation revealed acute suppurative appendicitis with ulcerations extending deep into muscularis, covered with a suppurative and fibrinous exudate. An infiltration by numerous neutrophils, eosinophils plasma cells and lymphocytes was observed through all layers and into the serosa (Fig.1A). After hematoxylin-eosin staining and immunofluorescence labeling using the anti-*Blastocystis* Paraflor B monoclonal antibody

(Boulder Diagnostics), parasitic forms were detected both in the lumen and in the lamina propria of the mucosa (Fig. 1B-C). Real-time PCR for *Blastocystis* detection was performed as previously described (4) using DNA extracted from stools, appendix, peritoneal liquid and Douglas Pouch, which were all positive. Small Subunit rDNA amplification followed by cloning of the PCR product and sequencing of 5 clones was subsequently performed from all the DNA samples in order to subtype (ST) *Blastocystis* isolates and detect mixed infections (5). ST3 was identified in all the analyzed compartments. Mixed infection with ST2 and ST3 was only detected in the stools. The SSU rDNA gene sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession nos. KJ605630 to KJ605649. The child completely recovered after appendectomy, removal of a stercolith from the appendix lumen, and treatment with tinidazole 20 mg/kg/d and ceftriaxone 50 mg/kg/d for 10 days, together with gentamicin 5 mg/kg/d for 5 days. Although tinidazole is not the first line drug for *Blastocystis* treatment, it was associated with complete recovery and total clearance of parasites from the stools at day 40 (negative detection of *Blastocystis* by light microscopy and real-time PCR). Data obtained from mother's child revealed simultaneous cases of gastroenteritis in 26 family members: 13 adults, ages between 34 and 98-year-old, and 13 children between 18-month-old and 15-year-old, residing in the same building at the residential "Mohammadi" area of Casablanca. Adults presented mild or moderate diarrhea but symptoms were more severe in children who all suffered abundant diarrhea, vomiting and weight loss. Repatriation in France of an 18-month-old baby was considered but his condition finally improved. Finally, none of the family members required hospitalization. No microbiological explorations were performed, and these data could not be objectivized.

## Conclusions

Reports of *Blastocystis* association with diarrhea and clinical symptoms in both immunocompetent and immunocompromised patients have increased in the last two decades. Tissue invasion of *Blastocystis* in the appendix (6) or in the colon mucosa (3), associated with acute or chronic inflammation, has been reported previously. However, there is still a controversy over whether this parasite is commensal or pathogenic. The current case further supports the invasive and inflammatory potential of this parasite. Previous reports regarding the presence of *Blastocystis* in 4 out of 100 appendix specimens from patients with acute

93 appendicitis (7), and of pseudo-appendicular illness, which led to an appendectomy in children  
94 with intestinal infection caused by this parasite (8), suggest that *Blastocystis* infection could be  
95 associated with appendicitis. Nevertheless, the actual role of *Blastocystis* in the pathogenesis of  
96 appendicitis remains controversial. In this report, the presence of a stercolith, which can be found  
97 in 50-80% of appendicitis cases, suggested mechanical obstruction of the appendix's lumen,  
98 which is the main aetiology of appendicitis. Furthermore, we report dissemination of  
99 *Blastocystis* into the lumen, the mucosa, and the Douglas Pouch exudate, associated with  
100 appendicular acute inflammation, while no other infectious agents were detected. These  
101 observations together with the well-documented acute or chronic inflammation occurring in  
102 human or animal *Blastocystis* infections (3,9), likely support the contribution of this infection to  
103 the inflammatory process. Infection with ST3 further reinforced this hypothesis. Indeed, the  
104 presence of pathogenic strains among ST3 has been confirmed by experimental infections in rats  
105 (9). Additionally, a substantial inflammatory reaction and an increased propagation of human  
106 colorectal cancer cells exposed to *Blastocystis* ST3 antigens has been demonstrated *in vitro* (10).  
107 In humans, the pathogenicity of different STs is unclear and remains as a controversial issue.  
108 ST1 isolates were found to be more prevalent among symptomatic patients in Lebanon (5) but  
109 ST3 was found to be the only ST revealing pathogenic potential in Malaysian patients when  
110 compared to ST1 and ST2 (11). ST3 was also found to be more significantly associated with  
111 diarrhea in Libya (12). In the current case, the fact that only ST3 was detected in all analyzed  
112 compartments, whereas a mixed infection with ST2 and ST3 was found in the child's stools  
113 further supports the high invasive potential of ST3. Interestingly, ST3 is the most common ST in  
114 Europe, but, in African countries, its frequency varies from 17.8% in Libya (12) to 61.9% in  
115 Egypt (13). In Morocco, a 28.7% prevalence of blastocystosis has been reported but data  
116 concerning the ST distribution of the parasite are not available (14). Furthermore, although  
117 *Blastocystis* infection could not be confirmed among the child's relatives, the simultaneous  
118 occurrence of gastroenteritis cases in the same family and the absence of other infectious agents  
119 in the child's stools suggest a potential *Blastocystis* outbreak. Spreading of *Blastocystis* could  
120 have occurred within the child's family, as previously reported in Italy, where two adopted  
121 children originating from India and the Ivory Coast transmitted *Blastocystis* to their adoptive  
122 parents and grandmother (15). A possible acquisition of this parasite from a common source such  
123 as contaminated water could also explain family transmission. Altogether, this data highlights the

interest of both systematic parasitological examinations of stools in patients with invasive infections returning from countries with high *Blastocystis* prevalence and routine provision of imidazoles for peritonitis empiric treatment.

## **Acknowledgements**

We thank the members of the team “Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens” of the Pasteur Institute of Lille, especially Sadia Benamrouz and Karine Guyot for their support. This work was supported by grants from the “Programme Orientations Stratégiques” from the University of Lille 2, the “Centre National de la Recherche Scientifique”, and the Pasteur Institute of Lille. DES and MO were both supported by PhD fellowships from the “Conseil National de la Recherche Scientifique” and the Azm & Saade Association from Lebanon, and AC by a PhD fellowship from the Pasteur Institute of Lille and the University of Lille 2.

Dr Fréalle is a hospital practitioner and researcher in Lille University Hospital Center and Pasteur Institute of Lille. Her primary research interests are respiratory fungal and intestinal parasitic infections, with special emphasis on biodiversity and pathogenesis.



## References

1. Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, van Vugt M, Goorhuis A, and van Gool T. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. BMC Infect Dis 2013;13:389.
2. Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis*--diagnostic limitations. Trends Parasitol 2009;25:23-9.
3. Janarthanan S, Khoury N, Antaki F. An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. Endoscopy 2011;43 Suppl 2:E185-6.
4. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. J Clin Microbiol 2011;49:975-83.
5. El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. Am J Trop Med Hyg 2013;88:1203-6.
6. Lintong PM, Sambuaga MK, Tambajong EH. Acute suppurative appendicitis with *Blastocystis hominis*. Asian Pac J Trop Dis 2012;S965-8.
7. Thanikachalam MP, Kasemsuk Y, Mak JW, Sharifah Emilia TS, Kandasamy P. A study of parasitic infections in the luminal contents and tissue sections of appendix specimens. Trop Biomed 2008;25:166-72.
8. Fleta Zaragoza J, Clavel Parrilla A, Castillo García FJ, Bueno Lozano M, Sarría Chueca A. *Blastocystis hominis* and abdominal pain in childhood. An Esp Pediatr 1993;38:13-6.
9. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. Parasitol Res 2008;102:853-60.
10. Kumarasamy V, Kuppusamy UR, Samudi C, Kumar S. *Blastocystis* sp. subtype 3 triggers higher proliferation of human colorectal cancer cells, HCT116. Parasitol Res 2013;112:3551-5.
11. Tan TC, Suresh KG, Smith HV. Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. Parasitol Res 2008;104:85-93.

- 172 12. Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Al-Mekhlafi AM, Ahmed A, Surin J. Subtype  
173 distribution of *Blastocystis* isolates in Sebha, Libya. PloS One 2013;8:e84372.
- 174 13. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, et al. Subtype analysis of  
175 *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. Parasitol Res 2010;106:505-11.
- 176 14. El Guamri Y, Belghyti D, Barkia A, Tiabi M, Aujjar N, Achicha A, et al. Parasitic infection  
177 of the digestive tract in children in a regional hospital center in Gharb (Kenitra, Morocco):  
178 some epidemiological features. East Afr J Public Health 2011;8:250-7.
- 179 15. Guglielmetti P, Cellesi C, Figura N, Rossolini A. Family outbreak of *Blastocystis hominis*  
180 associated gastroenteritis. Lancet 1989;2:1394.

183 **Table 1. Time of sampling and results for microbiological examination of stools, appendix, Douglas pouch**  
184 **and peritoneal liquid.**

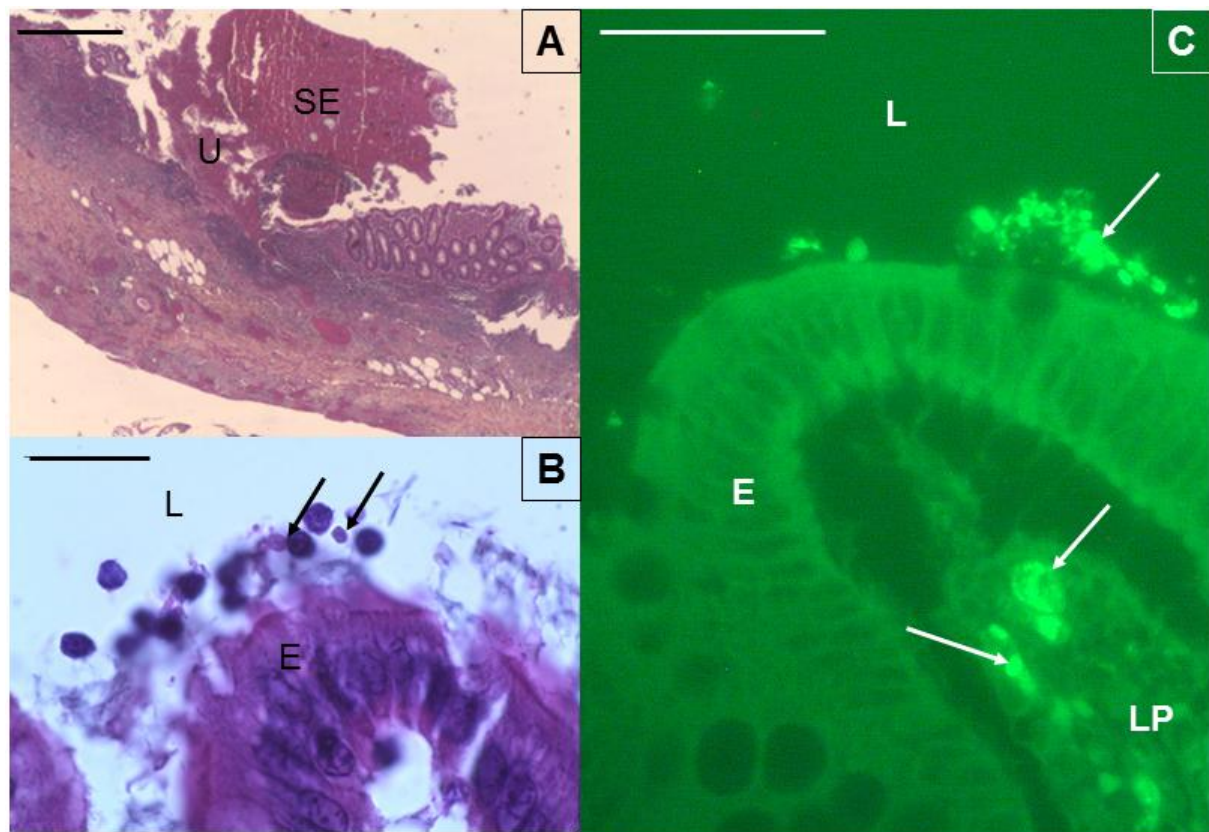
Time of sampling	Samples	Microbiological findings				
		Parasitology			Bacteriology (culture)	Virology (antigen detection)
		Light microscopy	Real-time PCR	<i>Blastocystis</i> subtype		
Aug 30 <sup>th</sup> 2013	Stool	Presence of <i>Blastocystis</i> Absence of <i>Cryptosporidium</i> or other parasites	<i>Blastocystis</i> : positive <i>Cryptosporidium</i> : negative	ST3 & ST2	Absence of <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>	Adenovirus and Rotavirus: Negative
Sept 1 <sup>st</sup> 2013	Appendix	Presence of <i>Blastocystis</i>	<i>Blastocystis</i> : positive	ST3	ND	ND
	Douglas pouch	ND*	Positive	ST3	Multimicrobial flora	ND
	Peritoneal liquid	ND	Positive	ST3	Multimicrobial flora	ND
Sept 5 <sup>th</sup> 2013	Stool	Presence of <i>Blastocystis</i>	ND	ND	Absence of <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>	Adenovirus and Rotavirus: Negative
Oct 27 <sup>th</sup> 2013	Stool	Negative	Negative	ND	ND	ND

185 \*ND=Not done

186

**Figure legend**

**Figure 1. Histopathological examination of appendix sections.** A. Ulceration (U) covered with suppurative and fibrinous exudates (SE) (hematoxylin-eosin). B. *Blastocystis* (arrow) in the lumen (L), and at the surface of the epithelium (E) (hematoxylin-eosin). C. *Blastocystis* (arrow) in the lumen, at the surface of the epithelium and in the lamina propria (LP) of the mucosa (immunofluorescence labeling with anti-*Blastocystis* ParaFlorB antibody).



# *Discussion*

---

## DISCUSSION

---

### **Le Liban : un pays à haut risque d'infection par *Blastocystis* sp.**

Dans une étude publiée en 2004, Hamze et al. ont déterminé la prévalence des parasites intestinaux au Nord-Liban entre 1997 et 2001 dans une population cumulée de 17126 patients. Par examen macroscopique puis microscopique des selles, ces auteurs ont montré que plus de 33% des patients analysés durant cette période étaient parasités (**Tableau 14**). Cette prévalence importante ne montrait que de faibles variations annuelles et *Entamoeba coli*, *Ascaris lumbricoides* et *Giardia intestinalis* étaient les parasites prédominants retrouvés dans cette population ce qui a d'ailleurs été en partie confirmé dans l'une de nos études (**Par. X.I.3.**). Ces données montraient donc que le Nord-Liban était une région très touchée par les infections parasitaires dues probablement aux problèmes de pollution de l'eau potable et à la consommation par la population de légumes et de certains fruits qui sont irrigués par des eaux polluées. Les données obtenues dans cette étude qui date maintenant de plus de 10 ans étaient basées sur des observations microscopiques des selles qui pouvaient bien entendu entraîner un biais selon l'expérience de l'observateur et ne prenaient pas en compte d'autres parasites intestinaux majeurs tel que *Blastocystis* sp. Aussi, dans le cadre d'une collaboration active avec le centre AZM de Tripoli et en utilisant des approches moléculaires plus sensibles, nous avons apporté les premières données de prévalence et de distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans cette même région du Nord-Liban.

Dans notre première étude focalisée sur une population totale de patients symptomatiques ou asymptomatiques suivis pour différentes pathologies dans plusieurs hôpitaux de Tripoli (**Par. I.1.**), le parasite a été identifié par microscopie dans 19% des échantillons de selles testés (42/220 patients). Or, cette méthode d'identification est comparativement moins sensible que les méthodes moléculaires (Stensvold et al 2007b,; Tan 2008 ; Dogruman-Al et al. 2010 ; Poirier et al. 2011 ; Roberts et al. 2011, 2013a ; Stensvold et al. 2012a ; Santos et Rivera 2013 ; Stensvold 2013a; Kumarasamy et al. 2014) ce que nous avons d'ailleurs pu clairement confirmer dans deux autres enquêtes réalisées au Liban focalisées sur des cohortes de patients diarrhéiques et d'écoliers (**Par. I.2. et I.3.**). De ce fait, même non négligeable, cette prévalence de 19% dans la population Libanaise était très probablement largement sous-estimée. D'ailleurs, dans une cohorte similaire d'une centaine de patients Libanais symptomatiques ou asymptomatiques analysée dans le cadre d'une autre étude visant à identifier les facteurs de risques animaux et environnementaux de transmission de *Blastocystis* sp. à l'homme (**Par. II.1.**), la prévalence du parasite était de l'ordre de 30% en utilisant la même méthode moléculaire d'identification. Quoiqu'il en soit, une prévalence

## DISCUSSION

---

comprise entre 20 et 30% au Liban est du même ordre de grandeur que celles déterminées par différentes méthodes dans des pays voisins comme en Iran (Moosavi et al. 2012), en Lybie (Alfellani et al. 2007, 2013c ; Abdulsalam et al. 2013a,b), en Egypte (Rayan et al. 2007) et dans certaines communautés en Israël (Ben-Shimol et al. 2014). Plus globalement, ces chiffres mettent en avant un risque parasitaire majeur dans tous les pays du Moyen-Orient.

Dans cette première cohorte de patients Libanais, nous avons pu sous-typer les isolats de *Blastocystis* sp. identifiés chez 36 des 42 patients positifs pour le parasite et ainsi obtenir les premières données concernant la distribution des STs de *Blastocystis* sp. au Liban. Les ST3 et ST2 (33,3%) étaient prédominants suivi de très près par le ST1 (30,8%) alors que le ST4 était très faiblement représenté (2,8%). Cette distribution était donc similaire à celle observée dans une majorité de pays à travers le monde et en particulier ceux du pourtour méditerranéen (Tan 2008 ; Alfellani et al. 2013c) (**Figure 12**). Ces données comme celles obtenues dans les autres enquêtes épidémiologiques menées par nos soins au Liban (**Par. I.2., I.3. et II.1.**), confirmaient de plus la quasi-absence du ST4 dans ce pays et plus globalement au Moyen-Orient. En effet, ce ST serait fréquent en Europe (**Figure 14**) comme au Danemark (Stensvold et al. 2011), en France (Poirier et al. 2011), en Espagne (Dominguez-Marquez et al. 2009) et aux Pays-Bas (Bart et al. 2013), en Australie (Roberts et al. 2013a) mais pas dans les autres continents ou régions géographiques comme le Moyen-Orient pour des raisons qui restent encore à clarifier (Alfellani et al. 2013c).

Toujours dans le cadre de cette première étude au Liban, une corrélation entre le ST1 et l'apparition de symptômes gastro-intestinaux a pu être mise en évidence soulignant donc la prédominance significative de ce ST chez les patients symptomatiques. Cependant, il faut naturellement rester prudent sur ce type de corrélation d'autant plus que l'identification du parasite dans cette cohorte de patients a été réalisée par observation microscopique. Depuis plusieurs années, la question de l'existence de STs plus « pathogènes » que d'autres, reste posée et discutée mais les résultats obtenus dans le cadre de nombreuses études épidémiologiques restent contradictoires (Tan et al. 2002, 2010 ; Tan 2004, 2008 ; Stensvold et al. 2009b; Scanlan 2012 ; Scanlan et Stensvold 2013 ; Clark et al. 2013 ; Wawrzyniak et al. 2013). Ces contradictions peuvent refléter de réelles différences de pathogénicité des isolats d'un ST à l'autre, d'un pays à l'autre ou d'une cohorte à l'autre. Cependant, de nombreux biais peuvent apparaître et fausser les analyses statistiques. Par exemple, les données cliniques obtenues pour chaque patient peuvent être incomplètes. En effet, les analyses bactériologiques et virologiques sont souvent trop lourdes à mettre en place dans une cohorte et ne sont en général pas réalisées sauf dans des cas précis de diarrhée sévère et/ou chronique (**Par. III.1.**).

## DISCUSSION

---

De ce fait, ces agents infectieux qui peuvent être à l'origine de troubles digestifs similaires à ceux de la blastocystose ne sont pas recherchés. De même, la présence d'autres protozoaires pathogènes n'est pas toujours mentionnée dans la fiche clinique du patient alors que ces microorganismes peuvent être responsables des mêmes symptômes. D'autre part, comme mentionné ci-dessus, la méthode d'identification de tous ces parasites dont celle de *Blastocystis* sp. doit être très sensible pour être au plus proche de leur réelle prévalence et donc moléculaire ce qui n'est à ce jour que rarement le cas. Pour toutes ces raisons, les données actuelles doivent être prises avec précaution et nos études menées au Liban vont en ce sens. En effet, le ST3 est prédominant dans toutes les cohortes de patients Libanais. Or, le ST1 n'est associé significativement à l'apparition de troubles digestifs que dans une seule de ces populations (**Par. I.1**). Actuellement, et comme le confirmerait nos données que ce soit au Liban ou en France, on s'orienterait plutôt vers l'existence d'isolats pathogènes et non pathogènes pour les principaux STs présents chez l'homme. Cependant, des données récentes obtenues *in vitro* suggèrent des différences de pathogénicité inter- et intra-ST des isolats (Wu et al. 2014b) et la grande diversité génétique observée au sein de certains STs pourrait en partie expliquer ces différences de virulence (Meloni et al. 2012 ; Stensvold et al. 2012b). D'autre part, il est évident que le statut « immunologique » de l'hôte est très probablement grandement impliqué dans la virulence potentielle des isolats mais celui-ci peut être difficilement évalué dans ce type d'enquête.

### **La situation alarmante de la blastocystose en Afrique et en Europe**

Curieusement, dans les pays industrialisés européens et dans les pays supposés à haut risque d'infection comme ceux du continent africain, très peu de données épidémiologiques sont disponibles dans la littérature concernant la prévalence de *Blastocystis* sp. En effet, en Afrique, une seule étude est référencée concernant l'identification de ce parasite par des méthodes moléculaires (Alfellani et al. 2013c) et englobe des cohortes limitées de patients originaires de Lybie, du Libéria et du Nigéria. Les prévalences observées dans ces pays sont pourtant comprises entre 28 et 70% confirmant l'impact potentiel majeur de *Blastocystis* sp. dans cette région géographique. Aussi, en collaboration avec le Centre de Recherche Biomédicale Espoir pour la Santé de Saint-Louis du Sénégal, nous avons donc déterminé la prévalence du parasite par PCR en temps réel dans une population d'une centaine d'enfants vivant dans 3 villages du Sénégal. La prévalence observée de 100% est la plus élevée jamais déterminée pour ce parasite dans une cohorte d'individus. Le « record » de prévalence était



## DISCUSSION

---

jusqu'alors détenu par un autre pays africain, le Libéria avec une valeur de 70% dans une population de 43 enfants âgés de 6 à 18 ans (Alfellani et al. 2013c). Dans la population sénégalaise, le ST3 était largement prédominant suivi des ST1 et ST2. Le ST4 était de nouveau très faiblement représenté (1,9% des isolats) ce qui confirmait sa quasi-absence en Afrique (Alfellani et al. 2013c). Cette distribution des STs était de plus similaire à celle observée à travers le monde et en particulier dans la plupart des pays africains pour lesquels des données moléculaires étaient disponibles (Hussein et al. 2008 ; Souppart et al. 2010 ; Fouad et al. 2011 ; Petrasova et al. 2011 ; Abdulsalam et al. 2013b) (**Figure 12**). Dans notre étude, plus de la moitié des enfants infectés par *Blastocystis* sp. présentaient aussi des troubles digestifs. De plus, le ST3 était prédominant dans le groupe des enfants symptomatiques. Or, ce même ST est significativement associé à des diarrhées dans un pays voisin, la Lybie (Abdulsalam et al. 2013a). Cependant, comme discuté précédemment, il faut rester prudent dans l'établissement de ce type d'association et d'ailleurs aucune corrélation n'a été recherchée au Sénégal entre ST et développement de symptômes car les enfants étaient infectés par de multiples parasites en plus de *Blastocystis* sp.

En France, la prévalence du parasite déterminée par PCR en temps réel atteint environ 18% ce qui est à mettre au même niveau d'infection que des pays voisins comme les Pays-Bas (Bart et al. 2013) et le Danemark (Stensvold et al. 2009b). Une première étude menée en 2007 en France montrait une prévalence d'environ 6% (Bourée 2007) mais cette valeur avait été déterminée par observation microscopique des selles. Plus récemment, Poirier et al. (2011) en développant leur méthode d'identification par PCR en temps réel estimaient la prévalence du parasite à 14,5% dans une population d'individus composée pour moitié de patients immunocompétents et pour autre moitié de patients immunodéprimés atteints de cancers hématologiques. Concernant la distribution des STs, Poirier et al. (2011) révélaient une prédominance du ST4 (63%) dans cette étude menée en Auvergne alors que Souppart et al. (2010) en sous-typant plus d'une quarantaine d'isolats obtenus dans le Nord de la France, montraient une nette prédominance du ST3 (53,5%). Cette différence dans la fréquence des STs pouvait naturellement s'expliquer par des sources de contamination différentes liées au fait que l'une des études avait été menée dans une région considérée comme rurale (Auvergne) et l'autre dans une zone dite urbaine (Nord de la France). Dans la présente étude, des variations géographiques significatives en termes de prévalence et de distribution des STs ont été mises en évidence. Par exemple, la région française la plus infectée était le Nord (Lille) avec une prévalence dépassant les 40% alors que l'Auvergne (Clermont-Ferrand) et la région Centre (Tours) semblaient moins touchées par la blastocystose avec une prévalence de

## DISCUSSION

---

l'ordre de 10%. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est difficile de relier ces variations à des sources de contamination différentes puisque nous n'avons pas d'informations sur les conditions d'hygiène des patients et sur la qualité de l'eau ou de la nourriture consommées par ces derniers. Des différences importantes de prévalence entre régions ont déjà été observées par exemple en Chine (Wang et al. 2002 ; Li et al. 2007a,b) sans qu'aucune explication n'ait été clairement formulée. Cependant, si la méthode d'identification du parasite pouvait en partie expliquer certaines différences observées en Chine, cette variable ne pouvait pas être mise en avant dans la présente étude. Pour ce qui est de la distribution globale des STs dans la population française, le ST3 était prédominant suivi des ST1, ST4 et ST2 comme dans de très nombreux pays (Alfellani et al. 2013c). De plus, ces valeurs confirmaient la fréquence importante du ST4 dans les pays européens (Alfellani et al. 2013c). En outre, même si le nombre d'isolats sous-typés restait assez faible pour chaque centre, on notait des variations géographiques significatives. Par exemple, le ST4 était prédominant à Besançon et à Clermont-Ferrand mais complètement absent à Créteil, à Lyon, à Nice et à Nîmes. Le ST1 était quant à lui absent à Nice et à Nîmes et le ST2 à Clermont-Ferrand, Créteil, Nîmes et Tours. De telles variations dans les fréquences des STs ont aussi été observées dans plusieurs régions de Chine (Yan et al. 2006 ; Li et al. 2007a,b) et reflétaient probablement des sources de transmission différentes qui restent à identifier (eau, nourriture, contact avec des animaux...) ou des différences dans la composition des cohortes. Enfin, la prévalence du parasite dans la population française était très variable selon que les prélèvements aient été réalisés en été ou en hiver. Ainsi, la prévalence de *Blastocystis* sp. était de 23,5% en été et seulement de 13,7% en hiver. De telles différences saisonnières ont déjà été observées dans plusieurs autres enquêtes et peuvent facilement s'expliquer par des facteurs de risques de transmission plus importants en été (consommation d'eau plus fréquente, de glaçons et de glaces, eaux de baignade contaminées par des matières fécales...) (Suresh et al. 2005 ; Amin 2006 ; Trabelsi et al. 2010 ; Ithoi et al. 2011 ; Haider et al. 2012 ; Laodim et al. 2012).

### **La prévalence de *Blastocystis* sp. dans des populations ciblées**

Dans la littérature récente, la question d'une augmentation significative de la prévalence de ce parasite chez les enfants ou chez des patients atteints de troubles digestifs reste encore assez contradictoire. Si nous prenons quelques exemples, aux Pays-Bas, la prévalence globale dans la population est de l'ordre de 25% (Bart et al. 2013) mais dépasse les 40% chez les enfants (Maas et al. 2014). De même, en Colombie, la prévalence de *Blastocystis* sp. atteint

## DISCUSSION

---

les 60% chez les enfants (Londono-Franco et al. 2014) alors qu'elle avoisine les 40% dans la population totale (Londono et al. 2009 ; Ramirez et al. 2013). Par contre, dans d'autres pays comme le Pakistan ou le Népal, les données montrent une prévalence plus faible chez les enfants que chez les adultes (Mehraj et al. 2008 ; Yoshikawa et al. 2009 ; Haider et al. 2012 ; Lee et al. 2012a). Plus globalement, plusieurs études proposent même une corrélation entre l'augmentation de l'âge et le risque d'infection à *Blastocystis* sp. (Hirata et al. 2007 ; Abu-Madi et al. 2010 ; Gonzalez-Moreno et al. 2011 ; Forsell et al. 2012 ; Abdulsalam et al. 2013a ; Benouis et al. 2013 ; Boonjaraspinyo et al. 2013 ; Calderaro et al. 2014 ; Engsbro et al. 2014). Là encore, on se doit de rester prudent quand des études menées dans un même pays ont été réalisées dans des régions différentes et selon un protocole d'identification du parasite différent. Dans notre cas, nous avons cherché à déterminer la prévalence du parasite dans une population d'écoliers scolarisés dans la même région du Nord-Liban que celle où ont été menées nos études précédentes dans la population totale et pour lesquelles nous obtenions une prévalence de l'ordre de 20 à 30% (**Par. I.1. et II.1.**). De plus, la méthode d'identification du parasite par PCR en temps réel était identique dans toutes ces enquêtes. Nos résultats sont donc sans équivoque puisque la prévalence de *Blastocystis* sp. observée chez ces enfants dépassait les 60% soit globalement le double ou le triple de celles observées dans des populations majoritairement composées d'adultes. D'après ces données, les enfants seraient donc plus susceptibles à l'infection par ce parasite ce qui pourrait être lié à différents facteurs comme une immunité déficiente surtout chez les jeunes enfants, des carences alimentaires nuisant au développement du système immunitaire, une promiscuité des enfants et surtout un faible niveau hygiénique de ceux-ci facilitant la transmission du parasite. De plus, au Sénégal, la prévalence du parasite atteint 100% chez une centaine d'enfants même si nous n'avons pas pu déterminer cette prévalence dans une cohorte d'adultes (**Par. I.4.**). Par contre, cette prévalence plus importante chez les enfants n'est pas clairement démontrée dans la population française (**Par. I.5.**) puisque le parasite est plus fréquent chez les 20-49 ans. C'est aussi par exemple le cas en Lybie où les adultes de plus de 18 ans sont significativement plus infectés que les enfants (Abdulsalam et al. 2013a) et en Suède avec un pic d'infection entre 35 et 60 ans (Forsell et al. 2012).

Pour ce qui est de la cohorte de patients diarrhéiques libanais, la prévalence du parasite atteint près de 63% à comparer avec les 20 à 30% dans la population totale. Cette augmentation est donc comme chez les enfants, tout à fait significative. Cependant, les données bactériologiques et virologiques n'ayant pas pu être obtenues pour ces patients, la question de la présence de *Blastocystis* sp. comme cause ou conséquence de ces diarrhées

## DISCUSSION

---

reste posée. Quoiqu'il en soit, le ST3 est prévalent dans cette cohorte de patients diarrhéiques ce qui confirme les études de Vassalos et al. (2010) et Abdulsalam et al. (2013a) menées en Grèce et en Lybie. Par contre Ramirez et al. (2013) ont mis en évidence une corrélation entre le ST2 et la présence de diarrhée alors que Stensvold et al. (2011) observaient une relation entre ce trouble digestif et le ST4.

### **Les facteurs de risque de transmission de *Blastocystis* sp.**

Sur la base de nos données moléculaires et des questionnaires remplis pour chaque patient inclus dans nos enquêtes au Liban (**Par. I.2. et I.3.**) et en France (**Par. I.5.**), nous avons cherché à déterminer certains facteurs de risque potentiels de contamination pour l'homme par *Blastocystis* sp. Ainsi un environnement urbain et certaines activités professionnelles étaient des facteurs de risque d'infection par le parasite dans la population de patients diarrhéiques Libanais ce qui n'était pas le cas du sexe ou de l'âge des patients ni des voyages récents faits par ces mêmes patients. D'après les données récoltées à partir de la cohorte d'écoliers Libanais, seul un âge supérieur à 9 ans et la présence d'un membre de la famille présentant des troubles digestifs et reflétant ainsi une possibilité de contamination intra-familiale étaient des facteurs de risque. Ce n'était par contre pas le cas du statut socio-économique, de voyages récents ou d'une eau non traitée. On voit donc clairement dans ces deux études des résultats d'analyses assez contradictoires voire même inattendus. Il en est de même en France puisque d'après l'enquête épidémiologique réalisée, le sexe, la catégorie socio-professionnelle ou le contact avec un animal de compagnie n'étaient pas des facteurs de risque au contraire de l'âge, d'un voyage récent ou du statut immunitaire du patient. D'ailleurs, curieusement, dans cette même étude, les patients immunodéprimés présentaient une prévalence significativement inférieure à celle des immunocompétents alors que *Blastocystis* sp. est souvent considéré comme un opportuniste. Cependant, les mêmes données révèlent que ces patients immunodéprimés voyagent beaucoup moins que les immunocompétents ce qui pouvait expliquer ces résultats. On voit donc la difficulté à interpréter toutes les données qui peuvent être assez contradictoires d'une population à l'autre mais ces contradictions peuvent refléter les différences observées entre ces populations en termes d'hygiène et de statut socio-économique. On note cependant dans les 3 études reprises ci-dessus une nette corrélation entre l'infection à *Blastocystis* sp. et la présence de douleurs abdominales. Si on analyse maintenant quelques études récentes à des fins de comparaison, il est évident que la manière de mener l'enquête peut faire varier tous les paramètres. Par

## DISCUSSION

---

exemple, en Lybie, Abdulsalam et al. (2013b) ont analysé 380 échantillons de selles d'une population totale. L'identification du parasite s'est faite par observation microscopique des selles suivie d'une mise en culture des selles positives. Or, l'identification du parasite est difficile par microscopie ce qui entraîne un premier biais important mais de plus, certains isolats cultivés ont été perdus. De ce fait, seule une partie de ces isolats ont été sous-typés et ces données de sous-typage ont ensuite été utilisées dans le cadre d'analyses statistiques alors qu'elles ne sont pas représentatives de la population de départ. Ces auteurs montrent ainsi que le ST1 est prévalent chez les femmes et chez les individus ayant un faible niveau d'éducation, que le ST2 est plus fréquent chez les individus ayant un faible niveau d'éducation et que le ST3 est prédominant chez les patients atteints de diarrhées. Dans une autre étude et à partir des mêmes données, ces auteurs montrent par contre une prévalence plus importante du parasite chez le sexe masculin et une association entre l'infection à *Blastocystis* sp. et des douleurs abdominales et des flatulences mais pas avec des diarrhées ce qui est très surprenant si on considère leurs premières analyses. Avec ces deux dernières études, on comprend aisément toute la difficulté à mettre en évidence ces facteurs de risque dont l'identification est directement liée à la qualité des informations obtenues pour une population donnée. Un contact direct avec des animaux et la consommation d'une eau non filtrée sont des facteurs de risque dans une population Népalaise d'après Lee et al. (2012a). De même ce contact avec des animaux et des voyages récents sont des facteurs de risque au Danemark pour Stensvold et al. (2009b).

### **La prévalence de *Blastocystis* sp. dans les échantillons environnementaux et la transmission du parasite par voie hydrique**

A ce jour, très peu d'études cherchant à identifier le parasite dans l'eau de consommation ont été réalisées. On peut citer les travaux de Khalifa et al. (2001), Suresh et al. (2005), Li et al. (2007a), Leelayoova et al. (2008), Eroglu et Koltas (2010), Mora et al. (2010), Banaticla et Rivera (2011), Ithoi et al. (2011), Abdulsalam et al. (2012) et Lee et al. (2012b) qui ont tous détecté le parasite dans des sources d'eaux utilisées par les populations humaine et animale pour leurs besoins. Par contre, seuls Leelayoova et al. (2008), Eroglu et Koltas (2010) et Lee et al. (2012b) ont sous-typé des échantillons environnementaux et proposé une transmission hydrique par comparaison des STs observés dans ces mêmes échantillons et ceux identifiés dans la population humaine consommant cette eau. Ce faible nombre de données nous a donc poussés à analyser un nombre important d'échantillons d'eau

## DISCUSSION

---

et de selles humaines et animales dans le même district d'Akkar au Nord-Liban. Nous avons ainsi pu montrer que 68% des échantillons d'eau étaient contaminés par le parasite tout comme 30% des échantillons humains et 80% des échantillons prélevés chez les bovins. De tels chiffres sont alarmants en termes d'impact potentiel en santé publique et confirment une transmission aisée du parasite par la voie hydrique. En effet, la distribution des 4 STs les plus fréquents identifiés dans ces échantillons environnementaux (ST3>ST1>ST2>ST4) est identique à celle observée pour les échantillons humains. Par contre, ces 4 STs sont quasiment-absents chez les bovins ce qui témoigne d'une transmission très limitée de ces STs à ces animaux. De même, les ST10 et ST14 largement prédominants chez les bovins, ne sont pratiquement pas retrouvés dans l'eau alors que ces échantillons environnementaux sont fréquemment souillés par des matières fécales animales. Pour expliquer ces résultats, on peut alors proposer une transmission des ST10 et ST14 par contact direct entre bovins et l'absence de toute forme kystique de résistance et de transmission de ces STs dans l'environnement mais ces hypothèses restent encore à confirmer.

### **La prévalence de *Blastocystis* sp. dans les échantillons animaux et l'évaluation du pouvoir zoonotique du parasite**

Comme nous l'avons indiqué dans l'analyse bibliographique (**Par. VI.**), un grand nombre de groupes d'animaux peuvent être infectés par *Blastocystis* sp. et quelques fois dans des proportions spectaculaires comme peut par exemple en témoigner le nombre d'échantillons de selle de bovins identifiées comme positives pour le parasite (80%) dans notre étude menée au Liban (**Par. II.1.**). Du fait du potentiel zoonotique confirmé du parasite par des données moléculaires (Arisue et al. 2003 ; Noël et al. 2003, 2005 ; Abe 2004 ; Parkar et al. 2007, 2010 ; Stensvold et al. 2009a ; Yoshikawa et al. 2009 ; Santin et al. 2011 ; Alfellani et al. 2013a,b), tous ces groupes d'animaux représentent donc des réservoirs éventuels de contamination d'où l'intérêt de pouvoir déterminer la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans ces populations animales afin d'évaluer un risque potentiel de transmission à l'homme. Nous l'avons d'abord fait chez les bovins pour lesquels les données moléculaires récentes (Yoshikawa et al. 2004c ; Stensvold et al. 2009a ; Fayer et al. 2012 ; Alfellani et al. 2013a) montraient une prédominance des ST10, ST14 et ST5 (**Tableau 15**). Ces mêmes STs ont été retrouvés dans une cohorte de bovins du Nord-Liban (**Par. II.1.**) avec une très forte prédominance des ST10 (44,6%) et ST14 (44,6%). Cependant, aucun des isolats de ces deux STs n'a été identifié dans la population humaine en contact

## DISCUSSION

---

direct avec ces animaux. Comme déjà suggéré précédemment, la transmission de ces deux STs se fait très probablement par contact direct entre les bovins. A cela s'ajoute sans doute une spécificité d'hôte stricte de ces STs expliquant sa non-transmission à l'homme. De ce fait, les bovins qui pourtant sont omniprésents dans de très nombreuses régions rurales à travers le monde ne représenteraient pas des vecteurs majeurs de transmission zoonotique de *Blastocystis* sp. à l'homme.

Dans la même optique, nous avons poursuivi notre étude épidémiologique chez un grand nombre d'animaux hébergés au zoo de La Palmyre en France, la finalité de cette enquête étant de compléter le peu d'analyses réalisées jusque-là dans des zoos (Abe et al. 2002 ; Stensvold et al. 2009a ; Parkar et al. 2010 ; Alfellani et al. 2013a,b ; Roberts et al. 2013b) où pourtant le nombre de taxa pouvant être échantillonnés est important. Ainsi 210 selles ont été récoltées chez 96 espèces animales différentes et analysées pour la présence de *Blastocystis* sp. Le pourcentage d'échantillons positifs avoisinait les 40% soulignant la forte prévalence du parasite dans ce zoo. C'est cependant chez les primates que l'on a retrouvé la plus forte prévalence avec plus de 62,5% des échantillons et 56,7% des espèces analysées positifs pour *Blastocystis* sp. Cette prévalence importante a déjà été observée chez les primates de zoos au Japon (85%) ou en Australie (86%) (Abe et al. 2002 ; Roberts et al. 2013b). Fait intéressant, *Blastocystis* sp. a été, dans notre étude, identifié chez tous les grands groupes de primates: les prosimiens (Lemuridae 9 échantillons sur 10), les singes du nouveau monde (Callitrichidae 4/15), les singes de l'ancien monde (Cercopithecidae 11/13), les « singes inférieurs » ou gibbons (Hylobatidae 2/3) et les grands singes (Hominidae 9/12). Par contre, ce parasite n'a pas été identifié dans une famille de singes du nouveau monde en l'occurrence les Cebidae (0/7) mais cette absence pourrait être liée au faible nombre d'échantillons analysés. Sur le plan moléculaire, 35 isolats de *Blastocystis* sp. de primates ont été génotypés avec l'identification de 5 STs différents : STs 1, 2, 3, 4 et 5. Si on excluait les 3 infections mixtes, les 32 isolats restant se répartissaient de la manière suivante : ST1 (37,1%), ST2 (20%), ST5 (20%), ST3 (8,6%) et ST4 (5,7%). Si on compare cette distribution des STs à celle présentée dans la publication récente d'Alfellani et al. (2013b) combinant les données de sous-typage déjà obtenues dans différentes études pour un total de 441 singes (**Figure 15**), on note de fortes similitudes. En effet, dans le récapitulatif d'Alfellani et al. (2013b), le ST1 est comme dans notre étude prédominant (30,8% des isolats). En termes de prévalence, le ST1 est suivi dans l'étude d'Alfellani et al. (2013b) des ST3 (26,1%) et ST2 (20,9%). Le ST2 était aussi fréquent dans notre population de singes ce qui n'est par contre pas le cas pour le ST3. Yoshikawa et al. (2009) n'avaient pas non plus identifié le ST3 dans une population de 10



## DISCUSSION

---

singes rhésus (*Macaca mulatta*). Pour ce qui est du ST4, il n'a été trouvé dans notre étude que chez les lémuriens. C'était aussi le cas de la majorité des isolats de ST4 identifiés par Alfellani et al. (2013b). Une autre forte similitude concernait le ST5 qui n'a été identifié dans notre étude que chez les Hominidae. Or, 20 des 24 isolats de ST5 identifiés par Alfellani et al. (2013b) l'ont été dans cette même famille de singes. Enfin, Alfellani et al. (2013b) avaient aussi identifié le ST8 dans plusieurs familles de singes (7,9% des isolats) et quelques isolats de STs minoritaires (STs 10, 13 et 15). Or, ces STs n'ont pas été retrouvés dans notre étude. En résumant, nos données comme celles de Alfellani et al. (2013b) suggèrent d'abord une certaine spécificité d'hôte des ST4 et ST5 chez les singes. En effet, le ST4 infecterait préférentiellement les lémuriens et le ST5 les hominidés ou grands singes. Pour ce qui est du ST3, il présenterait aussi une certaine spécificité d'hôte au sein des primates qui demeure cependant à clarifier. Toutes ces hypothèses restent encore à confirmer par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons pour toutes les familles de singes. Globalement, les STs 1 à 4 représentent dans notre étude comme dans celle de Alfellani et al. (2013b) plus de 80% des isolats identifiés chez les singes. Or ces 4 STs composent aussi plus de 90% des isolats génotypés chez l'homme (Alfellani et al. 2013c). Cette corrélation indique donc clairement que la transmission de ces STs peut naturellement se faire par contact entre les singes et l'homme. D'ailleurs Yoshikawa et al. (2009) ont clairement montré cette transmission entre des singes rhésus et des enfants au Népal et Parkar et al. (2010) entre des singes et leurs gardiens au zoo de Perth en Australie. La transmission inverse entre l'homme et l'animal est sans nul doute possible si on se base sur la faible spécificité d'hôte de ces STs. Cette transmission du parasite probablement aisée entre l'homme et les singes peut très probablement s'expliquer par leur origine évolutive commune et récente puisque la séparation des lignées de l'homme et des grands singes comme les chimpanzés et les gorilles n'est estimée qu'à quelques millions d'années. Le risque de transmission à l'homme à partir des singes semble donc être très élevé.

Concernant maintenant les oiseaux, très peu d'études ont été menées visant à déterminer la prévalence de *Blastocystis* sp. chez ce groupe d'animaux. D'après quelques études récentes (Stensvold et al. 2009a ; Alfellani et al. 2013a ; Ramirez et al. 2014), la prévalence de ce parasite chez les oiseaux serait très variable puisque comprise entre 7 et 90% selon les populations animales analysées. Par contre, dans toutes ces études, on observait une prédominance des ST6 et ST7 qui sont généralement considérés comme des STs aviaires (Noël et al. 2005). Or, ces STs ne sont que rarement retrouvés dans la population humaine (Alfellani et al. 2013c). Seules 5 espèces d'oiseaux du zoo de La Palmyre se sont avérées



## DISCUSSION

---

infectées ce qui témoigne d'une très faible prévalence de *Blastocystis* sp. De plus, seuls les STs 1, 4 et 5 ont été identifiés dans cette population animale. A notre connaissance, c'est la première fois que le ST5 est identifié chez les oiseaux et ce fut le cas chez l'autruche. Les STs aviaires n'ayant pas été détectés dans notre étude, il est donc probable que les infections observées chez les oiseaux par les STs 1, 4 et 5 soient plutôt transitoires et opportunistes et liées à un contact proche avec des selles humaines ou animales contaminées par le parasite. De ce fait, le risque de transmission du parasite des oiseaux à l'homme reste a priori très faible.

Pour ce qui est des Cetartiodactyla englobant surtout les bovins, 56,7% des échantillons étaient positifs pour *Blastocystis* sp. au zoo de La Palmyre. Sans surprise, les ST10 et ST14 ont été identifiés dans ce groupe d'animaux comme dans notre étude précédente au Liban (**Par. II.1.**) avec cependant une forte prédominance du ST10 ce qui est en accord avec les données obtenues précédemment par plusieurs auteurs (Stensvold et al. 2009a ; Fayer et al. 2012 ; Alfellani et al. 2013a). Comme discuté ci-dessus, ce groupe d'animaux ne représenterait pas un risque majeur de transmission à l'homme. Ce serait aussi le cas des *Perissodactyla* puisque seuls 3 espèces étaient infectées par le ST3 qui est aussi le ST dominant chez l'homme. C'est d'ailleurs à notre connaissance la première identification du parasite chez ces espèces (Baudet, Tapir et Zèbre) et du ST3 dans ce groupe d'animaux. Ce serait aussi le cas du groupe « Autres animaux », englobant plusieurs familles d'animaux et pour lequel les ST1, ST2 et ST3 ont été identifiés respectivement chez un Eléphant, un Capybara et une roussette. A noter les ST9 et ST10 identifiés chez une tortue et un kangourou alors que ces STs n'ont pratiquement jamais été trouvés chez l'homme.

Enfin, concernant les carnivores, la prévalence de *Blastocystis* sp. chez ce groupe d'animaux est très faible dans notre étude menée au zoo de La Palmyre puisqu'elle est de l'ordre de 8%. En effet, seules 4 espèces de carnivores testées étaient positives pour ce parasite en l'occurrence le Guépard, l'Otarie, l'Ours polaire et le Loup de Mackenzie. A notre connaissance, c'est d'ailleurs la première fois que *Blastocystis* sp. est identifié chez ces espèces animales. Dans ce groupe, 3 STs ont été identifiés en l'occurrence les ST1, ST2 et ST3 qui sont aussi prédominants chez l'homme. En fait très peu de données sont disponibles dans la littérature pour les carnivores sauvages. Seul le cas d'un Léopard infecté par du ST4 dans un zoo Australien a été relevé (Roberts et al. 2013b). De ce fait, vu le faible nombre d'échantillons analysés, il est difficile de savoir si ce groupe d'animaux est un réservoir majeur de transmission pour l'homme. Par contre des informations complémentaires sont disponibles dans la littérature ou ont pu être obtenues en France dans le cadre de ma thèse

## DISCUSSION

---

(**Par. II.3.**) pour des carnivores domestiques comme les chiens. Ces études sont d'autant plus intéressantes que les contacts entre ces animaux de compagnie et leurs maîtres peuvent être directs dans le cadre d'une cohabitation. La prévalence du parasite chez ces animaux peut d'ailleurs être spectaculaire puisque 70,8% des chiens étaient infectés en Australie (Duda et al. 1998), 36% au Chili (Lopez et al. 2006) et 28% en Iran (Daryani et al. 2008). Pourtant, on note de très fortes variations de prévalence dans ces populations canines d'un pays à l'autre ou au sein d'un même pays (**Tableau 16**). Ainsi, dans une étude récente portant sur 240 chiens échantillonnés en Australie (80), au Cambodge (80) et en Inde (80), la prévalence de *Blastocystis* sp. n'était que de 2,5% dans la région de Brisbane, de 1.3% au Cambodge mais de 24% en Inde (Wang et al. 2013). Cependant, cette prévalence plus importante du parasite chez les chiens en Inde pouvait s'expliquer par la nature de la cohorte analysée puisqu'elle était principalement composée de chiens errants plus facilement parasités. En Colombie, 37% d'une population de 40 chiens étaient infectés par le parasite et toujours par du ST2 (Ramirez et al. 2014). Dans une autre étude menée en Australie englobant 56 chiens, aucun d'entre eux n'était infecté par le parasite (Roberts et al. 2013b) et il en était de même dans une étude menée en Grèce sur 72 chiens (Spanakos et al. 2011). Notre étude portant sur 116 chiens de compagnie (**Par. II.3.**) allait aussi dans le sens d'une très faible prévalence du parasite chez ces animaux puisque seuls 4 d'entre eux se sont avérés parasités soit 3,5% de la population analysée. De plus, ces chiens étaient infectés par des isolats de ST2 et ST10. Ce ST2 est fréquent chez de nombreux groupes d'animaux et chez l'homme alors que le ST10 est fréquent chez les bovins et autres Cetartiodactyles comme nous l'avons vu précédemment. On ne retrouve donc pas dans notre étude comme dans celle de Ramirez et al. (2014) de ST spécifique des Canidae. D'ailleurs, il a été récemment montré que des chiens en contact avec leurs maîtres porteurs de *Blastocystis* sp. ST1, ST3 ou ST4 étaient eux-mêmes infectés par des isolats de mêmes STs (Nagel et al. 2012) laissant penser à une infection occasionnelle des chiens par l'homme. Ainsi, la nature moléculaire des isolats identifiés et la faible prévalence du parasite dans la plupart des populations canines analysées suggèrent que le chien ne serait pas un hôte naturel de *Blastocystis* sp. et donc pas un facteur de risque majeur de transmission à l'homme.

### **Le pouvoir invasif et pathogène de *Blastocystis* sp. : étude d'un cas clinique**

Clarifier la physiopathologie de ce parasite n'était pas une thématique prioritaire de ma thèse qui était plus axée sur l'épidémiologie moléculaire et la transmission de *Blastocystis* sp.

## DISCUSSION

---

Cependant, dans le cadre de l'analyse d'un cas clinique, j'ai eu l'opportunité de me pencher sur cette question et de mettre en évidence une association entre le parasite et le développement d'une appendicite purulente et d'une péritonite chez une jeune patiente. *Blastocystis* sp. est un parasite du tube digestif avec un tropisme bien défini puisqu'il infecte le côlon de son hôte (Tan 2008 ; Clark et al. 2013). Les médecins lillois ayant pris en charge cette patiente à son retour d'un séjour au Maroc furent frappés par la présence en nombre important de microorganismes identifiés comme étant *Blastocystis* sp. dans les selles d'où notre collaboration dans cette étude. En analysant par différentes approches des prélèvements de selles, de liquide péritonéal, d'appendice et d'exsudat du cul-de-sac de Douglas de la patiente (**Figure 30**), ce même parasite a été détecté dans ces échantillons par des méthodes moléculaires, immunologiques et histologiques supportant le caractère invasif de *Blastocystis* sp. Chez cette patiente, l'origine de l'appendicite était vraisemblablement une obstruction mécanique comme dans une majorité de cas. Cette obstruction a été suivie d'une dissémination du parasite dans la lumière et la muqueuse du côlon et de l'appendice ainsi que dans l'exsudat du cul-de-sac de Douglas couplée à une inflammation aiguë de l'appendice. *Blastocystis* sp. était donc clairement associé à cette inflammation puisqu'aucun autre agent pathogène n'a été détecté confirmant ainsi son pouvoir pathogène. De plus, après appendicectomie de la patiente et traitement avec un nitro-imidazole de 2<sup>ème</sup> génération proche du métronidazole, le tinidazole, le parasite n'a plus été retrouvé dans les selles de la patiente quelques semaines après le début du traitement. A ce jour, quelques cas de colite ou d'appendicite en relation avec une infection à *Blastocystis* sp. ont été recensés (Andiran et al. 2006 ; Lucia et al. 2007 ; Thanikachalam et al. 2008 ; Tai et al. 2011 ; Lintong et al. 2012) mais notre étude est la première à confirmer la présence du parasite dans ce contexte par des méthodes moléculaires. Ce cas ouvre donc, pour les professionnels de santé, des perspectives futures intéressantes en termes de recherche du parasite et de son impact clinique dans des pathologies similaires. D'autre part, s'est naturellement posée la question de l'origine de cette infection par *Blastocystis* sp. et très vite, une eau contaminée par le parasite et consommée par la patiente a été proposée comme source de transmission. En effet, en plus de cette patiente, pas moins de 26 autres membres de sa famille (13 adultes et 13 enfants) résidant dans le même bâtiment et réunis pour une fête familiale ont souffert d'une gastro-entérite avec comme point commun, la consommation de cette eau. Aucune analyse n'a pu être réalisée chez les autres membres de cette famille ni sur des échantillons d'eau mais une épidémie de blastocystose d'origine hydrique a été logiquement proposée. C'est là encore un résultat majeur obtenu dans le cadre de cette étude puisque les exemples d'épidémie de blastocystose

## DISCUSSION

---

d'origine hydrique sont extrêmement rares dans la littérature (Guglielmetti et al. 1989 ; Wu et al. 2000).

A

Année	Sexe	Patients examinés	Patients parasités	Prévalence (%)
1997	M	1660	506	30,48
	F	2128	699	32,84
	Total	3788	1205	31,81
1998	M	1468	453	30,85
	F	1989	624	31,37
	Total	3457	1077	31,15
1999	M	1425	423	29,68
	F	1944	690	35,49
	Total	3369	1113	33,03
2000	M	1466	498	33,96
	F	2003	793	35,59
	Total	3469	1291	37,21
2001	M	1254	412	32,85
	F	1789	615	34,37
	Total	3043	1027	33,74
Total		17126	5713	33,35

M : masculin.  
F : féminin.

B

Tableau 2 Répartition totale des parasites chez les malades infectés

Année	Sexe	A. <i>lumbricoides</i>		Taenia spp.		H. <i>nana</i>		Enter. <i>vermicularis</i>		Trichuris <i>trichiura</i>		Ent. <i>coli</i>		G. <i>lamblia</i>		Ent. <i>histolytica</i>		Trich. <i>intestinalis</i>		Total
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
1997	M	186	36,75	13	2,56	2	0,40	1	0,20	2	0,40	183	36,17	100	19,76	18	3,56	5	0,98	506
	F	244	34,91	27	3,86	1	0,14	4	0,57	0	0	283	40,49	112	16,02	25	3,58	10	1,43	699
	Total	430	35,68	40	3,31	3	0,25	5	0,41	2	0,17	466	38,67	212	17,59	43	3,57	15	1,25	1205
1998	M	161	35,54	7	1,54	3	0,66	3	0,66	0	0	174	38,41	74	16,34	26	5,74	7	1,55	453
	F	215	34,46	44	7,05	0	0	3	0,48	0	0	262	41,99	76	12,18	30	4,80	8	1,29	624
	Total	376	34,91	51	4,73	3	0,28	6	0,56	0	0	436	40,48	150	13,93	56	5,20	15	1,39	1077
1999	M	163	38,53	13	3,07	2	0,47	0	0	0	0	147	34,76	77	18,21	22	5,20	4	0,94	423
	F	272	39,42	21	3,04	4	0,58	3	0,43	0	0	272	39,42	85	12,32	25	3,62	13	1,88	690
	Total	435	39,08	34	3,05	6	0,54	3	0,27	0	0	419	37,65	162	14,56	47	4,22	17	1,52	1113
2000	M	176	35,34	13	2,61	2	0,40	2	0,40	2	0,40	177	35,55	101	20,28	24	4,82	5	1,00	498
	F	309	38,97	24	3,02	2	0,25	2	0,25	0	0	291	36,70	117	14,75	44	5,55	10	1,26	793
	Total	485	37,57	37	2,85	4	0,31	4	0,31	2	0,16	468	36,18	218	16,93	68	5,28	15	1,16	1291
2001	M	157	38,11	8	1,94	1	0,24	0	0	0	0	160	38,84	60	14,56	23	5,58	5	1,21	412
	F	239	38,86	18	2,92	2	0,32	2	0,32	1	0,16	248	40,33	77	12,52	24	3,90	10	1,63	615
	Total	396	38,66	26	2,53	3	0,29	2	0,19	1	0,10	408	39,73	137	13,34	47	4,58	15	1,46	1027
Total		2122	37,14	188	3,3	19	0,33	20	0,35	5	0,09	2197	38,45	879	15,39	261	4,57	77	1,35	5713

N : nombre de cas.  
M : masculin.  
F : féminin.

**Tableau 14 :** Détermination du nombre de patients infectés par des parasitoses intestinales de 1997 à 2001 au Nord-Liban (A) et répartition des parasites identifiés par année dans cette population (B) (Hamze et al. 2004).

**Tableau 15:** Distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans différentes populations de vaches à travers le monde.

Pays	Sous-types de <i>Blastocystis</i> sp.							Total	Références
	ST1	ST3	ST5	ST7	ST10	ST14	Mixtes		
Japon	1	1	6	-	?	?		8	Yoshikawa et al. 2004 <sup>a</sup>
Danemark	-	-	3	-	22	-	-	25	Stensvold et al. 2009
Etats-Unis	-	-	-	-	13	1	2 <sup>b</sup>	16	Fayer et al. 2012
Angleterre	1	-	1	-	3	-	2	7	Alfellani et al. 2013b
Lybie	-	-	2	-	6	2	5	15	Alfellani et al. 2013b
Liban	4	-	5	1	41	41	29	121	Présente étude
Total	6 (3.1%)	1 (0.5%)	17 (8.9%)	1 (0.5%)	85 (44.2%)	44 (23%)	38 (19.8%)	192	

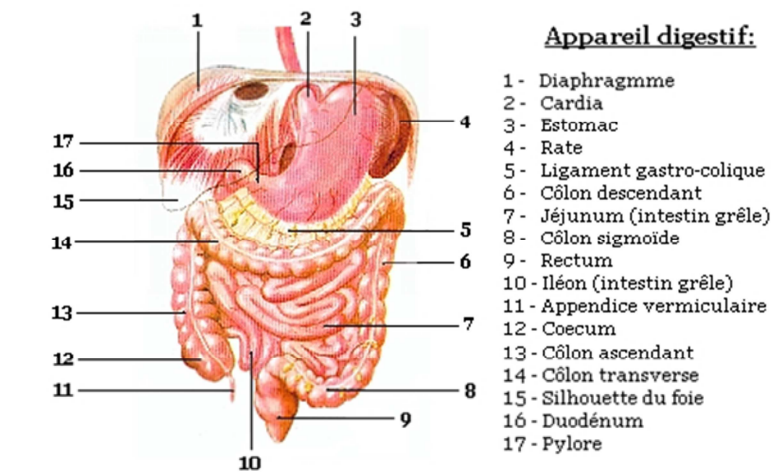
- a. La technique STS-PCR utilisée dans cette étude ne permet de sous-typer que les isolats des ST1 à ST7.  
b. Deux infections mixtes par des isolats de ST10 et ST14 ont été identifiées dans cette étude.

**Tableau 16:** Distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans différentes populations de chiens à travers le monde.

[illegible]

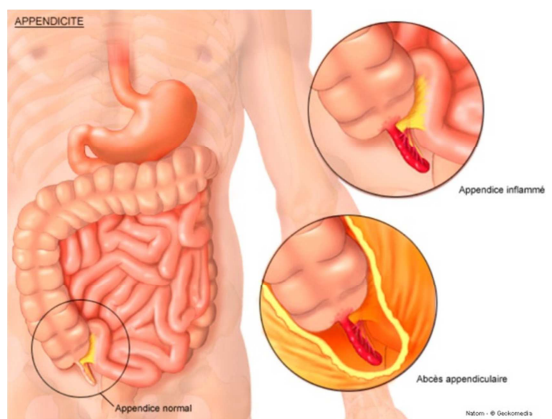
Chiens semi-domestiques	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cambodge	80	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Wang el al. 2013
Chiens errants	<i>Canis lupus familiaris</i>	Sikkim, Delhi, Mumbai, Inde	80	19	9	-	-	2	1	7	-	-	-	-	-	Wang el al. 2013
Chiens domestiques	<i>Canis lupus familiaris</i>	France	116	4	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	Présente étude



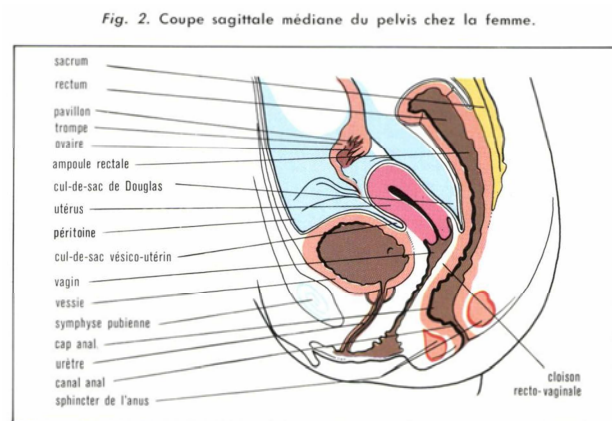


A

B



C



**Figure 30 :** Description de l'appareil digestif (A), localisation de l'appendice (B) et du cul-de-sac de Douglas (C).

Sources des images :

(<http://dilaurus.org/Defecart/-hygiene%20et%20sante.htm>) (A)

(<http://www.chirurgie-beaujolais.fr/specialites/chirurgie-viscerale/appendicite/>) (B)

(<http://www.larousse.fr/archives/grande-encyclopedie/page/11528>) (C)

# *Conclusion et perspectives*

---

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Nos travaux ont apporté une contribution significative à l'étude de l'épidémiologie moléculaire, de la transmission et de la pathogénicité du protiste parasite *Blastocystis* sp. En particulier, une très forte prévalence du parasite a été mise en évidence au Liban comme au Sénégal et à un moindre degré en France dans la population humaine soulignant ainsi l'impact socio-économique de la blastocystose dans les pays en développement. Il est clair que l'absence ou le manque de systèmes d'assainissement de l'eau couplés à des conditions d'hygiène précaires dans ces pays représentent les principaux problèmes expliquant la transmission aisée de parasites d'origine hydrique comme *Blastocystis* sp. Preuve en est la proportion très importante d'échantillons d'eau identifiés comme positifs pour ce parasite au Nord-Liban. La situation vis-à-vis de *Blastocystis* sp. devient donc alarmante et nos enquêtes épidémiologiques fournissent les informations nécessaires aux autorités de santé publique de certains pays pour mettre en place, de manière urgente, des programmes de prévention (analyse de la qualité de l'eau, éducation des populations vis-à-vis des modes de transmission des parasitoses digestives...) et de contrôle visant à réduire l'impact du parasite dans ces populations à risque. L'un des objectifs de la collaboration Franco-Libanaise mise en place dans le cadre de ma thèse est justement de créer dans un futur proche une unité spécialisée dont le rôle sera de surveiller l'évolution d'agents pathogènes comme *Blastocystis* sp. au Liban (Projet en cours d'évaluation déposé conjointement en Mai 2014 dans le cadre du Programme Hubert Curien CEDRE 2015). A ce jour, malgré des avancées significatives lors de ces dernières années, la prévalence et la distribution des STs du parasite restent encore non déterminées pour de nombreux pays et entre autre, pour certains pays du pourtour méditerranéen voisins du Liban et de la France comme la Tunisie. Ce manque devrait être rapidement comblé dans le cadre d'une collaboration entre l'Institut Pasteur de Lille et celui de Tunis et du dépôt conjoint en Mai 2014 d'un projet dans le cadre du Programme Hubert Curien UTIQUE 2015.

A partir des données moléculaires obtenues dans nos enquêtes épidémiologiques et des informations collectées pour chaque patient à travers des questionnaires standardisés, nous avons cherché à déterminer des facteurs de risque de transmission de *Blastocystis* sp. à l'homme. Ces facteurs de risque sont difficilement mis en évidence car souvent liés à la diversité de la population étudiée. Par exemple, un voyage récent à l'étranger est, dans la population française étudiée, un facteur de risque mais ce n'est curieusement pas le cas de l'immunodépression. Or, il est possible que l'immunodépression n'ait pas, comme attendu, été identifiée comme un facteur de risque en France car les patients immunodéprimés voyagent moins que les individus globalement en bonne santé. La complexité des cohortes

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

analysées rend donc toute analyse des données extrêmement complexe. A cela s'ajoute des incohérences entre études menées dans différents pays ou au sein d'un même pays. Ces incohérences peuvent être prioritairement liées à la méthode choisie pour l'identification du parasite. En effet, nous avons confirmé dans nos différentes études la faible sensibilité de la microscopie comparée à une méthode moléculaire comme la PCR en temps réel développée par Poirier et al. (2011). De ce fait, un groupe de patients positifs pour *Blastocystis* sp. déterminé par microscopie ne sera pas le même que celui déterminé par PCR en temps réel dans la même cohorte. Par conséquent, les analyses statistiques des données des patients positifs déterminés par ces deux méthodes n'aboutiront a priori pas aux mêmes conclusions. Il est donc grand temps de pouvoir standardiser les études épidémiologiques à venir à des fins de comparaison et nous proposons d'utiliser la méthode de PCR en temps réel comme méthode standard. La méthode d'identification du parasite comme la nature de la population étudiée peuvent aussi expliquer les discordances relevées dans la littérature concernant une éventuelle corrélation entre les STs de *Blastocystis* sp. et le développement de troubles digestifs. Nous avons par exemple montré une prédominance du ST1 chez les patients symptomatiques dans une première cohorte de patients Libanais que nous n'avons pas retrouvée dans une seconde population vivant pourtant dans la même zone géographique. Globalement, une synthèse de toutes les données disponibles dans la littérature propose l'existence d'isolats pathogènes et non pathogènes pour tous les principaux STs ce qui semble se confirmer dans nos études.

Ce parasite ayant un pouvoir zoonotique confirmé, il était donc judicieux de rechercher *Blastocystis* sp. dans les selles d'un grand nombre d'animaux afin d'identifier les sources animales potentielles de contamination pour l'homme. D'après nos résultats, les primates sont globalement très infectés par *Blastocystis* sp. et de plus par les mêmes STs que ceux identifiés chez l'homme et représenteraient donc une source majeure de transmission zoonotique. Curieusement, cela ne semble pas être le cas d'animaux de ferme comme les bovins ou les oiseaux ni d'animaux de compagnie comme les chiens. Nous allons maintenant chercher à confirmer ces observations à travers deux enquêtes. La première qui est en cours vise à analyser les selles de tous les animaux hébergés au zoo de Lille. Cette étude est très intéressante car les données obtenues permettront de confirmer ou de compléter celles collectées au zoo de La Palmyre. En effet, certains groupes d'animaux sont communs aux deux zoos mais d'autres ne sont présents qu'au zoo de Lille comme un nombre important de reptiles hébergés au sein d'un vivarium. La seconde enquête sera quant à elle menée dans le cadre du Programme Hubert Curien CEDRE 2015 et visera à évaluer le risque de transmission

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

zoonotique de *Blastocystis* sp. à l'homme dans la filière poulet de chair qui est très développée au Liban. La particularité de cette étude sera de comparer les STs des isolats identifiés dans les fientes d'oiseaux et dans les selles des personnels des abattoirs de cette filière. Une autre grande interrogation concerne la pathogénicité de *Blastocystis* sp. chez les animaux puisqu'aucune étude majeure n'est disponible dans la littérature à ce sujet. Les enquêtes prévues à l'avenir dans plusieurs populations animales devront donc prendre en considération l'état de santé des animaux et en particulier, ceux infectés par ce parasite (Chapman et al. 2009).

Enfin, même si la pathogénicité de *Blastocystis* sp. ne serait plus à prouver au regard de la littérature récente, notre étude a cependant révélé l'implication du parasite dans le développement d'une inflammation de l'appendice couplé à une péritonite chez une patiente. Ces observations se doivent d'être confirmées chez d'autres patients ayant des tableaux cliniques similaires en associant identification moléculaire du parasite et analyse histologique des tissus comme nous l'avons réalisé dans notre étude. Plus globalement, et afin de clarifier la physiopathologie du parasite et sa dynamique d'infection tout en apportant des réponses quant à la pathogénicité de certains isolats ou STs, il est indispensable de pouvoir développer un modèle animal reproductible de blastocystose permettant de passer en routine un nombre important d'isolats à des fins de comparaison. Ce développement est actuellement en cours dans l'équipe BDPEE chez le rat et bénéficie de la disponibilité de multiples isolats maintenus en culture axénique au laboratoire. Il est aussi urgent de pouvoir identifier des facteurs de virulence du parasite qui pourraient être ST-dépendants. Pour les identifier, une large analyse de génomique comparative a été initiée dans l'équipe BDPEE prenant en compte des isolats des ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7 et ST8. Enfin, la pathogénicité de certains isolats peut être corrélée à leur action sur le microbiote intestinal de l'hôte. Afin de savoir si une infection par certains isolats de *Blastocystis* sp. serait capable d'induire une dysbiose et les symptômes qui en découlent, des analyses de métagénomique ont été initiées dans l'équipe afin de déterminer la composition de la flore bactérienne d'hôtes infectés ou non infectés. A ce jour, les hôtes étudiés sont le rat dans le cadre du développement d'un modèle animal ainsi que l'homme et le singe dans le cadre de nos enquêtes épidémiologiques.

# *Références bibliographiques*

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abdel-Hafeez EH, Ahmed AK, Ali BA, Moslam FA (2012). Opportunistic parasites among immunosuppressed children in Minia District, Egypt. *Korean J Parasitol.* 50:57–62
- Abdulsalam A, Ithoi I, Al-Mekhlafi H, Ahmed A, Surin J, Mak J (2012). Drinking water is a significant predictor of *Blastocystis* infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology.* 139: 1014-1020
- Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Khan AH, Ahmed A, Surin J, Mak JW (2013a). Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasit Vectors.* 6: 86
- Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Al-Mekhlafi AM, Ahmed A, Surin J (2013b). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates in Sebha, Libya. *PLoS One.* 8:e84372.
- Abe N (2004). Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet Parasitol.* 120: 235–242
- Abe N, Nagoshi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa H (2002). A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol.* 106:203–212
- Abe N, Wu Z, Yoshikawa H (2003a). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. *Vet. Parasitol.* 113: 321–325
- Abe N, Wu H, Yoshikawa H (2003b). Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol Res.* 90: 124–128
- Abe N, Wu Z, Yoshikawa H (2003c). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol Res.* 89:393–396
- Abu-Madi MA, Behnke JM, Doiphode SH (2010). Changing trends in intestinal parasitic infections among long-term-residents and settled immigrants in Qatar. *Parasit Vectors.* 3:98
- Adamu H, Wegayehu T, Petros B (2013). High prevalence of diarrhoeagenic intestinal parasite infections among non-ART HIV patients in Fitcha Hospital, Ethiopia. *PLoS One.* 8:e72634.
- Agholi M, Hatam GR, Motazedian MH (2013). HIV/AIDS-associated opportunistic protozoal diarrhea. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 29:35-41
- Aguiar JI, Goncalves AQ, Sodre FC, Pereira Sdos R, Boia MN, Lemos ER DE, Daher RR (2007). Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 40:631–634
- Alemu A, Shiferaw Y, Getnet G, Yalew A, Addis Z (2011). Opportunistic and other intestinal parasites among HIV/AIDS patients attending Gambi higher clinic in Bahir Dar city, North West Ethiopia. *Asian Pac J Trop Med.* 4:661-665

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Alexeieff A (1910). Sur les kystes de *Trichomonas intestinalis* dans l'intestin des batraciens. Bull sci France Belg. 44: 333-356
- Alexeieff A (1911). Sur la nature des formations dites kystes de *Trichomonas intestinalis*. C R Soc Biol. 71: 296-298
- Alfellani MA, Khan AH, Al-Gazoui RM, Zaid MK, Al-Ferjani MA (2007). Prevalence and clinical features of *Blastocystis hominis* infection among patients in Sebha, Libya. Sultan Qaboos Univ Med J. 7(1):35–40
- Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG (2013a). Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. Protist. 164(4):497–509
- Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, Levecke B, Tannich E, Clark CG, Stensvold CR (2013b). Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. Parasitology. 140 (8): 966–971
- Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG (2013c). Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop. 126(1):11–18
- Al-Tawil YS, Gilger MA, Gopalakrishna GS, Langston C, Bommer KE (1994). Invasive *Blastocystis hominis* infection in a child. Arch Pediatr Adolesc Med. 148(8):882–885
- Amato Neto V, Rodríguez Alarcon RS, Gakiya E, Ferreira CS, Bezerra RC, dos Santos AG (2004). Blastocystosis: a high proportion of cases found in schoolchildren of São Paulo, State of São Paulo, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 37(4):354-356
- Amin O (2002). Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. Am J Trop Med Hyg. 66:799-803
- Amin O (2006). Epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. Res J Parasitol. 1:1–10
- Andiran N, Acikgoz ZC, Turkay S, Andiran F (2006). *Blastocystis hominis*-an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. J Pediatr Surg. 41:1489–1491
- Anuar TS, Ghani MK, Azreen SN, Salleh FM, Moktar N (2013). *Blastocystis* infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. Parasit Vectors. 6:40
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, Yano TA, Hasegawa M (2002). Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. J Eukaryot Microbiol. 49: 42-53
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H (2003). Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. Parasitology. 126:1–9



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Arslan MO, Sari B, Kulu B, Mor N (2008). The prevalence of intestinal parasites in children brought to the Kars Maternal and Children's Hospital with complaints of gastrointestinal symptoms. *Turkiye Parazitol Derg.* 32:253-256
- Baldursson S, Karanis P (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res.* 45: 6603-6614
- Balint A, Dóczy I, Bereczki L, Gyulai R, Szűcs M, Farkas K, Urbán E, Nagy F, Szepes Z, Wittmann T, Molnár T (2014). Do not forget the stool examination!-cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitol Res.* 113:1585–1590
- Banaticla JE, Rivera WL (2011). Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines. *J Water Health.* 9: 128-137
- Barret HP (1921). A method for the cultivation of *Blastocystis*. *Ann Trop Med Parasitol.* 15: 113-116
- Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJ , Vugt M, Goorhuis A, van Gool T (2013). Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis.* 13: 389
- Basualdo JA, Cordoba MA, De Luca MM, Ciarmela ML, Pezzani BC, Grenovero MS, Minvielle MC (2007). Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina, 2002–2003. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 49:251–255
- Batista MW, Pierrotti LC, Abdala E, Clemente WT, Girao ES, Rosa DRT, Ianhez LE, Bonazzi PR, Lima AS, Fernandes PFCBC, Padua-Neto MV, Bacchella T, Oliveira APP, Viana CFG, Ferreira MS, Shikanai-Yasuda MA (2011). Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. *Trop Med Int Health.* 16:1134–1142
- Becker SL, Lohourignon LK, Speich B, Rinaldi L, Knopp S, N’Goran EK, Cringoli G, Utzinger J. (2011). Comparison of the Flotac-400 dual technique and the formalin-ether concentration technique for diagnosis of human intestinal protozoon infection. *J Clin Microbiol.* 49:2183–2190
- Benouis A, Bekkouche Z, Benmansour Z (2013). Epidemiological study of human intestinal parasitosis in the Hospital of Oran (Algeria). *International Journal of Innovation and Applied Studies.* 4:613-620
- Ben-Shimol S, Sagi O, Greenberg D (2014). Differences in prevalence of parasites in stool samples between three distinct ethnic pediatric populations in southern Israel, 2007–2011 *Parasitology International.* 63: 456–462
- Boeck WC, Drbohlav J (1925). The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11: 235-238

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Böhm-Glönig B, Knobloch J, Walderich B (1997). Five subgroups of *Blastocystis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Trop Med Int Health*. 2:771–778
- Boonjaraspinyo S, Boonmars T, Kaewsamut B, Ekobol N, Laummaunwai P, Aukkanimart R, Wonkchalee N, Juasook A, Sriraj P (2013). A cross-sectional study on intestinal parasitic infections in rural communities, northeast Thailand. *Korean J Parasitol*. 51:727-734
- Boorom K, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li L-H, Zhou X-N, Ok U, Leelayoova S, Jones M (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors*. 1:40
- Borges JD, Alarcón RSR, Neto VA, Gakiya E (2009). [Intestinal parasitosis in Indians of the Mapuera community (Oriximiná, State of Pará, Brazil): high prevalence of *Blastocystis hominis* and finding of *Cryptosporidium* sp and *Cyclospora cayetanensis*]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 42(3): 348–50.
- Boreham PF, Stenzel DJ (1993). *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv Parasitol*. 32: 1-70
- Bourée P (2007). *Blastocystis* : commensal ou pathogène? Étude de 590 cas et revue de la littérature. *Antibiotiques*. 9:20-24
- Brumpt, E. 1912. *Blastocystis hominis* n.sp. et formes voisines. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 5: 725-730.
- Calderaro A, Montecchini S, Rossi S, Gorrini C, De Conto F, Medici MC, Chezzi C, Arcangeletti MC (2014). Intestinal parasitoses in a tertiary-care hospital located in a non-endemic setting during 2006-2010. *BMC Infect Dis*. 16:14:264.
- Canete R, Diaz M, Avalos Garcia R, Laud Martinez P, Manuel Ponce F (2012). Intestinal parasites in children from a day care centre in Matanzas City, Cuba. *PLoS One*. 7: e51394
- Carbajal JA, Del Castillo L, Lanuza MD, Villar J, Borrás R (1997). Karyotypic diversity among *Blastocystis hominis* isolates. *Int J Parasitol*. 27: 941–945
- Carrascosa M, Martínez J, Pérez-Castrillon JL (1996). Hemorrhagic proctosigmoiditis and *Blastocystis hominis* infection. *Ann Intern Med*. 124:9
- Cassano N, Scoppio BM, Loviglio MC, Vena GA (2005). Remission of delayed pressure urticaria after eradication of *Blastocystis hominis*. *Acta Derm Venereol*. 85:357–358
- Cassidy MF, Stenzel DJ, Boreham PFL (1994). Electron microscopy of surface structures of *Blastocystis* sp. from different hosts. *Parasitol Res*. 80:505–511
- Cavalier-Smith T (1986). The kingdoms Chromista: origin and systematics. *Progress in Physiological Research*. Biopress Ltd. 4: 366-369

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Cekin A, Cekin Y, Adakan Y, Tasdemir E, Koclar F, Yolcular B (2012). Blastocystosis in patients with gastrointestinal symptoms: a case-control study. *BMC Gastroenterol.* 12: 122
- Chan KH, Chandramathi S, Suresh K, Chua KH, Kuppusamy UR (2012). Effects of symptomatic and asymptomatic isolates of *Blastocystis hominis* on colorectal cancer cell line, HCT116. *Parasitol Res.* 110:2475–2480
- Chandramathi S, Suresh K, Kuppusamy UR (2010). Solubilized antigen of *Blastocystis hominis* facilitates the growth of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitol Res.* 106: 941-945
- Chapman S, Thompson C, Wilcox A, Russell K. (2009). What is your diagnosis? Rectal scraping from a dog with diarrhea. *Vet Clin Pathol.* 38:59-62
- Chen TL, Chan CC, Chen HP, Fung CP, Lin CP, Chan WE, Liu CY (2003). Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg.* 69:213–216
- Chen XQ, Singh M, Ho LC, Moe KT, Tan SW, Yap EH (1997). A survey of *Blastocystis* sp. in rodents. *Lab Anim Sci.* 47:91–94
- Chen XQ, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Yap EH (1999). *In vitro* encystation and encystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitology* 118:151–160
- Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G (1999). Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *Eur J Epidemiol.* 15:989–993
- Clark CG (1997). Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol Biochem Parasitol.* 87:79–83
- Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR (2013). Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol.* 82:1–32
- Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB (2012). *Blastocystis*: to treat or not to treat... *Clin Infect Dis.* 54:105–110
- Cruz Licea V, Plancarte Crespo A, Morán Álvarez C, Valencia Rojas S, Rodriguez Sasnechez G, Vega Franco L (2003). *Blastocystis hominis* among food vendors in xochimilco markets. *Rev Latinoam Microbiol.* 45:12–5
- Dagci H, Ustun S, Taner M, Ersoz G, Karacasu F, Buda S (2002). Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta Trop* 81: 116–121
- Dagci H, Kurt O, Demirel M, Ostan I, Azizi NR, Mandiracioglu A, Yurdagul C, Tanyuksel M, Eroglu E, Ak M (2008). The prevalence of intestinal parasites in the province of Izmir, Turkey. *Parasitol Res.* 103:839–845

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Daryani N, Barmaki GH, Ettehad M, Sharif MH, Dehghan A et al (2006). A cross-sectional study of *Blastocystis hominis* in primary school children, Northwest Iran. *Inter J Trop Med*. 1:53–57
- Daryani A, Sharif M, Amouei A (2008). *Blastocystis* sp. a neglected zoonotic protozoan. *Proc.ASEAN Congr.Trop.Med.Parasitol*. 3:59-62
- Daryani A, Sharif M, Nasrolahei M, Khalilian A, Mohammadi A, Barzegar G. (2012). Epidemiological survey of the prevalence of intestinal parasites among schoolchildren in Sari, northern Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 106(8): 455–459.
- Davis SL, Dan L (2010). Emerging human rights issues in China's response to HIV/AIDS. *HIV AIDS Policy Law Rev*. 15:55-56
- Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier- Armanet C, Couloux A, Poulain J, Segurens B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng GC, Tan KS, Artiguenave F, Jaillon O, Aury JM, Delbac F, Wincker P, Vivare CP, El Alaoui H (2011). Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol*. 12:R29
- Dilek AR ,Dilek N, Saral Y(2012). The role of protozoa in the etiology of chronic urticaria. *Dermatol Sin*. 30:90–92
- Dinleyici EC, Eren M, DoganN, Reyhanioglu S, Yargic ZA, Vandenplas Y (2011). Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* or metronidazole in symptomatic children with *Blastocystis hominis* infection. *Parasitol Res*. 108:541–545
- Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M (2008). A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 103: 685-689
- Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, Araz E, Boorom K (2009). *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104:724–727
- Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorom K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, Kustimur S, Altinbas A (2010). Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS One*. 5:e15484
- Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R (2009). High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol Res*. 105:949-955
- Drakulovski P, Bertout S, Locatelli S, Butel C, Pion S, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Peeters M, Mallié M. (2014). Assessment of gastrointestinal parasites in wild chimpanzees (*Pan troglodytes troglodytes*) in southeast Cameroon. *Parasitol Res*. 113:2541-50
- Duda A, Stenzel DJ, Boreham PF (1998). Detection of *Blastocystis* sp. in domestic dogs and cats. *Vet Parasitol*. 76:9–17

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Dunn LA, Boreham PFL, Stenzel DJ (1989). Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *Int J Parasitol.* 19:43–56
- Dunn LA, Tan KSW, Vanelle P, Juspín T, Crozet MD, Terme T, Upcroft P, Upcroft JA, (2012). Development of metronidazole-resistant lines of *Blastocystis* sp. *Parasitol Res.* 111: 441–450
- Düzyol D, Kilimcioğlu AA, Ozyurt BC, Ozkan H, Girginkardeşler N (2012). Incidence of intestinal parasites detected in the Department of Parasitology in Celal Bayar University Hospital between 2006 and 2010. *Türkiye Parazitol Derg.* 36:147-151
- El Guamri Y, Belghyti D, Barkia A, Tiabi M, Aujjar N, Achicha A, El Kharrim K, Elfellaki L (2011). Parasitic infection of the digestive tract in children in a regional hospital center in Gharb (Kenitra, Morocco): some epidemiological features. *East Afr J Public Health.* 8:250-257
- Elwakil HS, Talaat RM (2009). Genetic analysis of *Blastocystis hominis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* 39: 99-109.
- Elwakil HS, Hewedi IH (2010). Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitol Res.* 107: 685-689
- Engsbro AL, Stensvold CR, Vedel Nielsen H, Bytzer P (2014). Prevalence, incidence, and risk factors of intestinal parasites in Danish primary care patients with irritable bowel syndrome. *Scand J Infect Dis.*46:204-209.
- Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS (2009). Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol Res.* 105:1589–1592
- Eroglu F, Koltas IS (2010). Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitol Res.* 107: 841-845
- Espinoza YA, Huapaya PH, Roldán WH, Jiménez S, Arce Z, Lopez E (2008). Clinical and serological evidence of *Toxocara* infection in school children from Morrope district, Lambayeque, Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 50:101-105
- Fathy FM (2011). A study on *Blastocystis hominis* in food-handlers: diagnosis and potential pathogenicity. *J Egypt Soc Parasitol.* 41:433–453
- Fayer R, Santin M, Macarisin D (2012). Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res.* 111: 1349–1355
- Fayer R, Elsasser T, Gould R, Solano G, Urban J Jr, Santin M (2014). *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitol Res.* 113:1465-1472
- Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark CG, Evengard B (2012). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31:1689–1696

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Fouad SA, Basyoni MM, Fahmy RA, Kobaisi MH (2011). The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. Arab J Gastroenterol. 12: 194–200
- Garavelli PL (1991). The therapy of Blastocystosis. J Chemother. 3: 245–246.
- Giacometti A, Cirioni O, Fiorentini A, Fortuna M, Scalise G (1999). Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 18(6): 436–439.
- Gil FF, Busatti HG, Cruz VL, Santos JF, Gomes MA (2013). High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. Pathog Glob Health. 107:320-324
- Goh S, M. Reacher, Casemore D, Verlander NQ, Charlette A, Chalmers RM, Knowles M, Pennington A, Williams J, Osborn K, Richards S (2004). Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000. Emerg Infect Dis. 10: 1007-1015
- González-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M (2011). Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. Parasitol Res. 108:87–93
- Govind SK, Khairul AA, Smith HV (2002). Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. Trends Parasitol. 18: 528
- Gualdieri L, Rinaldi L, Petrullo L, Morgoglione ME, Maurelli MP, Musella V, Piemonte M, Caravano L, Coppola MG, Cringoli G (2011). Intestinal parasites in immigrants in the city of Naples (southern Italy). Acta Trop. 117:196–201
- Guglielmetti P, Cellesi C, Figura N, Rossolini A (1989). Family outbreak of *Blastocystis hominis* associated gastroenteritis. Lancet 2(8676):1394.
- Guimaraes S, Sogayar MI (1993). *Blastocystis hominis*: occurrence in children and staff members of municipal day-care centers from Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 88:427–429
- Gülmez D, Sarıbaş Z, Akyön Y, Ergüven S (2013). The results of Hacettepe University Faculty of Medicine Parasitology Laboratory in 2003-2012: evaluation of 10 years. Türkiye Parazitol Derg. 37:97-101
- Gupta R, and Parsi K (2006). Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. Australas J Dermatol. 47: 117-119
- Haghighi A, Salimi A, Nazemalhosseini M, Kazemi B, Rostami Nejad M, Rasti S (2009). Frequency of enteric protozoan parasites among patients with gastrointestinal complaints in medical centers of Zahedan, Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg. 103: 452–454.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Haider SS, Baqai R, Qureshi FM, Boorom K (2012). *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Entamoeba histolytica* exhibit similar symptomatic and epidemiological patterns in healthcare-seeking patients in Karachi. *Parasitol Res.* 111:1357-1368
- Hamamcı B, Cetinkaya U, Delice S, Erçal BD, Gücüyetmez S, Yazar S (2011). Investigation of intestinal parasites among primary school students in Kayseri-Hacılar. *Turkiye Parazitol Derg.* 35:96-99
- Hameed DM, Hassanin OM, Zuel-Fakka, NM (2010). Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol Res.* 108: 553-560
- Hameed DM, Hassanin OM (2011). Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol Res.* 108:553–560
- Hamze M, Dabboussi F, Al-Ali K, Ourabi L.(2004) [Prevalence of infection by intestinal parasites in north Lebanon: 1997-2001]. *East Mediterr Health J.* 10(3):343-8.
- Haresh K, Suresh K, Khairul Anus A, Saminathan S (1999). Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Trop Med Int Health.* 4: 274-277
- Herbinger KH, Fleischmann E, Weber C, Perona P, Loscher T, Bretzel G (2011). Epidemiological, clinical, and diagnostic data on intestinal infections with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* among returning travelers. *Infection.* 39:527–535
- Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N, Fujita J (2007). Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan. *Parasitol Res.* 101:1717-1719
- Ho LC, Singh M, Suresh G, Ng GC, Yap EH (1993). Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol Res.* 79: 614-616
- Ho LC, Singh M, Suresh K, Ng GC, Yap EH (1994). A study of the karyotypic patterns of *Blastocystis hominis* by pulse-field gradient electrophoresis. *Parasitol Res.* 80:620–622
- Ho LC, Armugam A, Jeyaseelan K, Yap EH, Singh M (2000). *Blastocystis* elongation factor-1 $\alpha$ : genomic organization, taxonomy and phylogenetic relationships. *Parasitology.* 121:135-144
- Ho LC, Jeyaseelan K, Singh M (2001). Use of the elongation factor-1 $\alpha$  gene in a polymerase chain reaction-based restriction-fragment-length polymorphism analysis of genetic heterogeneity among *Blastocystis* species. *Mol Biochem Parasitol.* 112:287–291
- Hoevers J, Holman P, Logan K, Hommel M, Ashford R, Snowden K (2000). Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. *Parasitol Res.* 86: 57-61
- Hoevers JD, Snowden KF (2005). Analysis of the ITS region and partial ssu and lsu rRNA genes of *Blastocystis* and *Proteromonas lacertae*. *Parasitology.* 131: 187-196

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Horiki N, Maruyama M, Fujita Y, Yonekura T, Minato S, Kaneda Y (1997). Epidemiological survey of *Blastocystis* infection in Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 56:370–374
- Hussain R, Jaferi W, Zuberi S, Baqai R, Abrar N, Ahmed A, Zaman V (1997). Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 56:301–305
- Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM (2008). Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res.* 102: 853-860
- Idris NS, Dwipoerwantoro PG, Kurniawan A, Said M (2010). Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. *J Infect Dev Ctries.* 4: 309-317
- Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, Kimata I (2007). Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol Int.* 56: 107-112
- Init I, Mak JW, Lokman Hakim S, Yong HS (1999). Strain differences in *Blastocystis* isolates as detected by a single set of polymerase chain reaction primers. *Parasitol Res.* 85: 131-134
- Init I, Foad AL, Fong MY, Yamazaki H, Rohela M, Yong HS, Mak JW (2007). Restriction enzyme digestion analysis of PCR-amplified DNA of *Blastocystis hominis* isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 38:991-997
- Inpankaew T, Traub R, Thompson R.C and Sukthana Y (2007). Canine Parasitic Zoonoses in Bangkok Temples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 38: 247-255
- Ithoi I, Jali A, Mak JW, Wan Sulaiman WY, Mahmud R (2011). Occurrence of *Blastocystis* in water of two rivers from recreational areas in Malaysia. *J Parasitol Res.* 2011:123916
- Janarthanan S, Khoury N, Antaki F (2011). An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. *Endoscopy.* 43 : E185–E186
- Jantermtor S, Pinlaor P, Sawadpanich K, Pinlaor S, Sangka A, Wilailuckana C, Wongsena W, Yoshikawa H (2013). Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in Northeastern Thailand. *Parasitol Res.* 112: 1781-1786
- Jiang JB, He JG (1993). Taxonomic status of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Today.* 9: 2-3
- Jimenez-Gonzalez D, Martinez-Flores W, Reyes-Gordillo J, Ramirez-Miranda M, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, Stark D, Souza-Salvidar V, Martinez-Hernandez, Flisser A, Olivo-Diaz A, Maravilla Pablo (2012). *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol Res.* 110: 1269-1275
- Johnson AM, Thanou A, Boreham PF, Baverstock PR (1989). *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Exp Parasitol.* 68: 283-288



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Jones M, 2nd, Ganac R, Hiser G, Hudson N, Le A, Whipps C (2008). Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitol Res.* 103: 551-557.
- Jones MS, Whipps CM, Ganac RD, Hudson NR, Boorom K (2009). Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitol Res.* 104:341-345.
- Jones WR (1946). The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica* ; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Ann Trop Med Parasitol.* 40: 130–140
- Jones-Engel L, Engel GA, Schillaci MA, Kyes K, Froehlich J, Paputungan U, Kyes RC (2004). Prevalence of enteric parasites in pet macaques in Sulawesi, Indonesia. *Am J Primatol.* 62:71–82
- Kaneda Y, Horiki N, Cheng XJ, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H (2001). Ribodemes of *Blastocystis* isolated in Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 65:393–396
- Karadag G, Tamer GS, Dervisoglu E (2013). Investigation of intestinal parasites in dialysis patients. *Saudi Med J.* 34:714-718
- Katsarou-Katsari A, Vassalos CM, Tzanetou K, Spanakos G, Papadopoulou C, Vakalis N (2008). Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm Venereol.* 88: 80-81
- Khalifa AM, El Tamsahy MM, Abou El Naga IF (2001). Effect of ozone on the viability of some protozoa in drinking water. *J Egypt Soc Parasitol.* 31: 603– 616
- Kick G, Rueff F, Przybilla B (2002). Palmoplantar pruritus subsiding after *Blastocystis hominis* eradication. *Acta Derm Venereol.* 82:60
- Koltas IS, Akyar I, Elgun G, Kocagoz T (2014). Feconomics®; a new and more convenient method, the routine diagnosis of intestinal parasitic infections. *Parasitol Res.* 113:2503-2508
- König G, Müller HE (1997). *Blastocystis hominis* in animals: incidence of four serogroups. *Zbl. Bakt.* 286, 435–440
- Kulik RA, Falavigna DL, Nishi L, Araujo SM (2008). *Blastocystis* sp. and other intestinal parasites in hemodialysis patients. *Braz J Infect Dis.* 12: 338-341
- Kumarasamy V, Kuppusamy UR, Samudi C, Kumar S (2013). *Blastocystis* sp. subtype 3 triggers higher proliferation of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitol Res.* 112: 3551-3555
- Kumarasamy V, Roslani AC, Rani KU, Kumar Govind S (2014). Advantage of using colonic washouts for *Blastocystis* detection in colorectal cancer patients. *Parasit Vectors.* 3(7):162

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari S, Sari I, Yuniastuti E, Djauzi S, Smith HV (2009). Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103: 892-898
- Lanuza MD, Carbajal JA, Borra's R (1996). Identification of surface coat carbohydrates in *Blastocystis hominis* by lectin probes. *Int J Parasitol.* 26:527–532
- Lanuza MD, Carbajal JA, Villar J, Borrás R (1997). Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitol Res.* 83:60–63
- Laodim P, Intapan PM, Sawanyawisuth K, Laummaunwai P, Maleewong W (2012). Hospital-based study of epidemiological and clinical data on *Blastocystis hominis* infection. *Foodborne Pathog Dis.* 9:1077-1082
- Lee IL, Tan TC, Tan PC, Nanthiney DR, Biraj MK, Surendra KM, Suresh KG (2012a). Predominance of *Blastocystis* sp. subtype 4 in rural communities, Nepal. *Parasitol Res.* 110:1553–1562
- Lee LL, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK (2012b). *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasit Vectors.* 5:130
- Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M (2002). In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol.* 96: 803-807
- Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M (2008). Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 79(3): 401–406.
- Leelayoova S, Siripattanapipong S, Naaglor T, Taamasri P, Mungthin M (2009). Prevalence of intestinal parasitic infections in military personnel and military dogs, Thailand. *J Med Assoc Thai;* 92 (1): S53-59
- Levy Y, Georger J, Shoenfeld Y (1996). Severe *Blastocystis hominis* in an elderly man. *J Infect.* 33:57–59
- Li LH, Zhou XN, Du ZW, Wang XZ, Wang LB, Jiang JY, Yoshikawa H, Steinmann P, Utzinger J, Wu Z, Chen JX, Chen SH, Zhang L (2007a). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol Int.* 56: 281-286
- Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, Steinmann P, Utzinger J, Tong XM, Chen SH, Zhou X N (2007b). Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res.* 102(1), 83–90.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Li J, Deng T, Li X, Cao G, Li X, Yan Y (2013). A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitol Res.* 112:3537-3541
- Lim YA, Ngui R, Shukri J, Rohela M, Mat Naim HR (2008). Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. *Vet Parasitol.* 157: 154–159
- Lintong, PM, Sambuaga MK, Tambajong EH (2012). Acute suppurative appendicitis with *Blastocystis hominis*. *Asian Pac J Trop Dis.* 2: S965–S968
- Londoño AL, Mejía S, Gómez-Marín JE (2009). Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitism in preschool children from the urban area of Calarcá, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota).* 11:72-81
- Londoño-Franco AL, Loaiza-Herrera J, Lora-Suárez FM, Gómez-Marín JE (2014). *Blastocystis* sp. frequency and sources among children from 0 to 5 years of age attending public day care centers in Calarcá, Colombia. *Biomedica.* 34:218-227
- Long H, Handschack A, König W, Ambrosch A (2001). *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitol Res.* 87: 1029-1030
- Longstreth G, Thompson W, Chey W, Houghton L, Mearin F, Spiller R (2006). Functional bowel disorders. *Gastroenterology.* 130: 1480-1491
- López J, Katia Abarca V, Patricio Paredes M, Elisa Inzunza T (2006). Intestinal parasites in dogs and cats with gastrointestinal symptoms in Santiago, Chile. *Rev Med Chil.* 134:193-200
- Lucía, J. F., Aguilar, C., & Betran, A. (2007). *Blastocystis hominis* colitis in a haemophilic patient as a cause of lower gastrointestinal bleeding. *Haemophilia.* 13(2). 224–225.
- Maas L, Dorigo-Zetsma JW, de Groot CJ, Bouter S, Plötz FB, van Ewijk BE (2014). Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 20(6):545-650
- Machicado JD, Marcos LA, Tello R, Canales M, Terashima A, Gotuzzo E (2012). Diagnosis of soil-transmitted helminthiasis in an Amazonian community in Peru using multiple diagnostic techniques. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106:333–339
- Maesano G, Capasso M, Ianniello D, Cringoli G, Rinaldi L (2014). Parasitic infections detected by FLOTAC in zoo mammals from Warsaw, Poland. *Acta Parasitol.* 59:343-353.
- Malheiros AF, Stensvold CR, Clark CG, Braga GB, Shaw JJ (2011). Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 85: 1050–1053
- Marcos LA, Gotuzzo E (2013). Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis.* 26:295-301.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Marques MVR, Junior FCF, Andery DA., Fernandes AA, de Araújo AV, de Resende JS & Martins NR. (2013). Serologic, parasitic, and bacteriologic assessment of captive cracids (Aves: Galliformes: Cracidae) in Brazil. *J Zoo Wildl Med.* 44(1): 27–34.
- Martiny D, Bart A, Vandenberg O, Verhaar N, Wentink-Bonnema E, Moens C, van Gool T (2013). Subtype determination of *Blastocystis* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33:529-536
- Martzen MR, Peanasky RJ (1985). *Ascaris suum*: biosynthesis and isoinhibitor profile of chymotrypsin/elastase isoinhibitors. *Exp Parasitol.* 59: 313-320
- Masucci L, Graffeo R, Bani S, Bugli F, Boccia S, Nicolotti N, Fiori B, Fadda G, Spanu T (2011). Intestinal parasites isolated in a large teaching hospital, Italy, 1 May 2006 to 31 December 2008. *Euro Surveill.* 16, pii: 19891
- Matsumoto Y, Yamada M, Yoshida Y (1987). Light-microscopical appearance and ultrastructure of *Blastocystis hominis*, an intestinal parasite of man. *Zbl Bakt Microbiol Hyg Ser A.* 264:379–385
- Mehraj V, Hatcher J, Akhtar S, Rafique G, Beg MA (2008). Prevalence and factors associated with intestinal parasitic infection among children in an urban slum of Karachi. *PLoS ONE.* 3:e3680
- Melhorn, H. (1988). *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912—are there different stages or species. *Parasitol Res.* 74: 393–395
- Meloni D, Poirier P, Mantini C, Noel C, Gantois N, Wawrzyniak I, Delbac F, Chabe M, Delhaes L, Dei-Cas E, Fiori PL, El Alaoui H, Viscogliosi E (2012). Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitol Int.* 61:719–722
- Micheloud D, Jensen J, Fernandez-Cruz E, Carbone J (2007). Chronic angioedema and *Blastocystis hominis* infection. *Rev Gastroenterol Peru.* 27:191–193
- Miné JC, Rosa JA (2008). Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the Parasitology Laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University, Araraquara. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41:565-569
- Minvielle MC, Pezzani BC, Cordoba MA, Deluca MM, Apeztequina MC, Basualdo JA (2004). Epidemiological survey of *Giardia* spp. and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. *Korean J Parasitol.* 42:121- 127
- Mirza H, Tan KS (2009). *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res.* 104:355–361
- Mirza H, Wu Z, Kidwai F, Tan FSW (2011a). A metronidazole-resistant isolate of *Blastocystis* spp. is susceptible to nitric oxide and downregulates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase by a novel parasite survival mechanism. *Infect immun.* 79:5019-5026

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Mirza H, Teo JDW, Upcroft J, Tan KSW (2011b). A rapid, high-throughput viability assay for *Blastocystis* spp. reveals metronidazole resistance and extensive subtype-dependent variations in drug susceptibilities. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 637-648
- Mirza H, Wu Z, Teo J, Tan K (2012). Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cell Microbiol.* 14: 1474-1484
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Ng GC, Chen XQ, Yap EH (1996). Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res.* 82: 439-444
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Ng GC, Yap EH (1997). Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol Res.* 83:319-325
- Moe KT, Singh M, Gopalakrishnakone P, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Yap EH (1998). Cytopathic effect of *Blastocystis hominis* after intramuscular inoculation into laboratory mice. *Parasitol Res.* 84:450-454
- Moghaddam DD, Ghadirian E, Azami M (2005). *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitol Res.* 96: 273-275
- Moosavi A, Haghighi A, Mojarad EN, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, Kazemi B, Zali MR (2012). Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitol Res.* 111:2311-2315
- Mora L, Martínez I, Figuera L, Segura M, Del Valle G (2010). Protozoans in superficial waters and faecal samples of individuals of rural populations of the Montes municipality, Sucre state, Venezuela. *Invest Clin.* 51:457-466
- Motazedian H, Ghasemi H, Sadjjadi SM (2008). Genomic diversity of *Blastocystis hominis* from patients in southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol.* 102:85-88
- Mumcuoğlu I, Coşkun FA, Aksu N, Pürnak T, Güngör C (2013). Role of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* spp. in Irritable Bowel Syndrome. *Türkiye Parazitol Derg.* 37:73-77
- Nagel R, Cuttall L, Stensvold C, Mills P, Bielefeldt-Ohmann H, Traub R (2012). *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Intern Med J.* 42: 1187-1195
- Nakamura Y, Hashimoto T, Yoshikawa H, Kamaishi T, Nakamura F, Okamoto K, Hasegawa M (1996). Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* that contains cytochrome-free mitochondria, inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1 alpha. *Mol Biochem Parasitol.* 77: 241-245
- Nascimento SA, Moitinho Mda L (2005). *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga City, Paraná State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 47:213-217

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Nasirudeen AM, Tan KS (2004). Isolation and characterization of the mitochondrion-like organelle from *Blastocystis hominis*. J Microbiol Methods. 58: 101-109
- Navarro C, Dominguez-Marquez MV, Garijo-Toledo MM, Vega-Garcia S, Fernandez-Barredo S, Perez-Gracia MT, Garcia A, Borrás R, Gomez-Munoz MT (2008). High prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs reared under intensive growing systems: frequency of ribotypes and associated risk factors. Vet Parasitol. 153:347–358
- Ng GC, Tan KSW (1999). Colony growth as a step towards axenization of *Blastocystis* isolates. Parasitol Res. 85:678–679
- Ngrenngarmlet W, Lamom C, Pasuvalertsakul S, Yaicharoen R, Wongjindaneon N, Sripochang S, et al. (2007). Intestinal parasitic infection among school children in Thailand. Trop Biomed J.24:83-88
- Nigro L, Larocca L, Massarelli L, Patamia I, Minniti S, Palermo F, Cacopardo B (2003). A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. J Travel Med. 10: 128-130
- Nimri L, Batchoun R (1994). Intestinal colonization of symptomatic and asymptomatic schoolchildren with *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 32: 2865-2866
- Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E (2005). Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. J Clin Microbiol. 43: 348-355
- Noel C, Peyronnet C, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Sogin ML, Capron M, Viscogliosi E, Zenner L (2003). Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. Mol Biochem Parasitol. 126:119–123
- Noor Azian MY, San YM, Gan CC, Yusri MY, Nurulsyamzawaty Y, Zuhazam AH, Maslawaty MN, Norparina I, Vythilingam I (2007). Prevalence of intestinal protozoa in an aborigine community in Pahang, Malaysia. Trop Biomed. 24: 55–62
- Ok UZ, Girginkardeşler N, Balcioglu C, Ertan P, Pirildar T, Kilimcioğlu AA (1999). Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. Am J Gastroenterol. 94:3245–3247
- Orden AB, Apezteguía MC, Ciarmela ML, Molina NB, Pezzani BC, Rosa D, Minvielle MC (2014). Nutritional status in parasitized and nonparasitized children from two districts of Buenos Aires, Argentina. Am J Hum Biol. 26:73-79
- Paboriboune P, Phoumindr N, Borel E, Sourinphoumy K, Phaxayaseng S, Luangkhot E, Sengphilom B, Vansilalom Y, Odermatt P, Delaporte E, Etard JF, Rabodonirina M (2014). Intestinal parasitic infections in HIV-infected patients, Lao People's Democratic Republic. PLoS One.24;9:e91452



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Pakandl M (1999). *Blastocystis* sp. from pigs: ultrastructural changes occurring during polyxenic cultivation in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol Res.* 85:743–748
- Parija SC, Jeremiah S (2013). *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop Parasitol.* 3:17-25
- Park SR, Han AR, Ban YH, Yoo YJ, Kim EJ, Yoon YJ (2010). Genetic engineering of macrolide biosynthesis: past advances, current state, and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 1227-1239
- Parker U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, Morris K, Thompson RC (2007). Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology.* 134, 359-367
- Parker U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RC (2010). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol.* 169:8–17
- Paschke C, Apelt N, Fleischmann E, Perona P, Walentiny C, Löscher T, Herbingen KH (2011). Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. *Clin Microbiol Infect.* 17:1194-1200
- Pasqui AL, Savini E, Saletti M et al (2004). Chronic urticaria and *Blastocystis hominis* infection: a case report. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 8:117–120
- Patino WD, Cavuoti D, Banerjee SK, Swartz K, Ashfaq R, Gokaslan T (2008). Cytologic diagnosis of *Blastocystis hominis* in peritoneal fluid: a case report. *Acta Cytol.* 52:718–720
- Pegelow K, Gross R, Pietrzik K, Lukito W, Richards AL, Fryauff DJ (1997). Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia. *Southeast Asia J Trop Med Public Health.* 28:173–190
- Pérez-Cordón G, Rosales MJ, Mar Gavira G, Valdez RA, Vargas F, Córdova O. (2007). Finding of *Blastocystis* sp. in bivalves of the genus *Donax*. *Rev Peru Biol.* 14(2): 301-302
- Pérez-Brocal V, Clark CG (2008). Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: complete sequences, gene content, and genome organization. *Mol Biol Evol.* 25:2475-2482
- Petrašova J, Uzlikova M, Kostka M, Petrz'elkova KJ, Huffman MA, Modry D (2011). Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. *Int J Parasitol.* 41:1113–1120
- Pipatsatitpong D, Rangsin R, Leelayoova S, Naaglor T, Mungthin M (2012). Incidence and risk factors of *Blastocystis* infection in an orphanage in Bangkok, Thailand. *Parasit Vectors.* 5:37

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El AH, Delbac F, Livrelli V (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 49:975–983
- Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares C, Delbac F and El Alaoui H (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 8: e1002545
- Poirier P, Meloni D, Nourrisson C, Wawrzyniak I, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F (2014). Molecular subtyping of *Blastocystis* spp. using a new rDNA marker from the mitochondria-like organelle genome. *Parasitology.* 141:670-681
- Prasad KN, Nag VL, Dhole TN, Ayyagari A (2000). Identification of enteric pathogens in HIV-positive patients with diarrhoea in northern India. *J Health Popul Nutr.* 18:23–26
- Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KS (2005). Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol Res.* 97: 386-389
- Puthia MK, Sio SW, Lu J, Tan KS (2006). *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infect Immun* 74: 4114-4123
- Puthia MK, Lu J, Tan KS (2008). *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-KappaB-dependent manner. *Eukaryot Cell.* 7:435–443
- Qadri SM, al-Okaili GA, al-Dayel F (1989). Clinical significance of *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol.* 27:2407–2409
- Quilez J, Sanchezacedo C, Clavel A, Causape AC (1995). Occurrence of *Blastocystis* sp. in cattle in Aragon, Northeastern Spain. *Parasitol Res.* 81, 703–705
- Rajah Salim H, Suresh Kumar G, Vellayan S, Mak J, Khairul Anuar A, Init I, Vennila GD, Saminathan R, Ramakrishnan K (1999). *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitol Res.* 85: 1032-1033
- Rajamanikam A, Govind SK (2013). Amoebic forms of *Blastocystis* spp.-evidence for a pathogenic role. *Parasit vectors.* 6:295
- Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR (2014). *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol.* 22:223-228
- Ramirez-Miranda ME, Hernandez-Castellanos R, Lopez-Escamilla E, Moncada D, Rodriguez-Magallan A, Pagaza-Melero C, Gonzalez-Angulo A, Flisser A, Kawa-Karasik S, Maravilla P (2010). Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case–control study. *Parasit Vectors.* 13:93–96



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Rayan HZ, Ismail OA, El Gayar EK (2007). Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *J Egypt Soc Parasitol.* 37: 599-608
- Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV (2009). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg.* 80(4): 588–592.
- Riisberg I, Orr RJ, Kluge R, Shalchian-Tabrizi K, Bowers HA, Patil V, Edvardsen B, Jakobsen KS (2009). Seven gene phylogeny of heterokonts. *Protist.* 160: 191-204
- Rivera WL (2008). Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Vet Parasitol.* 156:178–182
- Rivera WL, Tan MA (2005). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates in the Philippines by riboprinting. *Parasitol Res.* 96: 253-257
- Rivero-Rodríguez Z, Hernández A, Bracho Á, Salazar S, Villalobos R (2013). Prevalence of intestinal microsporidia and other intestinal parasites in hiv positive patients from Maracaibo, Venezuela. *Biomedica.* 33:538-545.
- Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D (2011). Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *Am J Trop Med Hyg.* 84: 308-312
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J (2013a). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32:335–343
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J (2013b) Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Vet Parasitol.* 196(1-2):85-89
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J (2014). Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog.* 6: 17
- Rossignol JF, Kabil SM, Said M, Samir H, Younis AM (2005). Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3: 987-991
- Sá RM, Petrášová J, Pomajbíková K, Profousová I, Petrželková KJ, Sousa C, Cable J, Bruford MW, Modrý D. (2013). Gastrointestinal symbionts of chimpanzees in Cantanhez National Park, Guinea-Bissau with respect to habitat fragmentation. *Am J Primatol.* 75(10), 1032–1041.
- Sajid M, McKerrow JH (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol.* 120: 1-21

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Saksirisampant W, Nuchprayoon S, Wiwanitkit V, Yenthakam S, Ampavasiri A (2003). Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani province. *J Med Assoc Thai.* 86 Suppl 2: S263-270
- Sanchez-Aguillon F, Lopez-Escamilla E, Velez-Perez F, Martinez-Flores WA, Rodriguez-Zulueta P, Martinez-Ocaña J, Martinez-Hernandez F, Romero-Valdovinos M, Maravilla P (2013).. Parasitic infections in a Mexican HIV/AIDS cohort. *J Infect Dev Ctries.* 7:763-766
- Santin M, Gomez-Munoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R (2011). Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res.* 109: 205-212
- Santos HJ, Rivera WL (2013). Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. *Asian Pac J Trop Med.* 6:780-784
- Santos HL, Sodr  FC, de Macedo HW (2014). *Blastocystis* sp. in splenic cysts: causative agent or accidental association? A unique case report. *Parasit Vectors.* 7:207
- Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I (2009). The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 167:81-94
- Scanlan PD (2012). *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol.* 28: 327-334
- Scanlan PD, Stensvold CR (2013). *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol.* 29:523-529
- Scicluna SM, Tawari B, Clark CG (2006). DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist.* 157: 77-85
- Sekar U, Shanthi M (2013). *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Trop Parasitol.* 3:35-39
- Shah M, Tan CB, Rajan D, Ahmed S, Subramani K, Rizvon K, Mustacchia P (2012). *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* Co-Infection Resulting in Chronic Diarrhea in an Immunocompetent Male. *Case Rep Gastroenterol.* 6:358-364
- Sigidaev AS, Kozlov SS, Tarasova EA, Suvorova MA (2013). Investigation of the genetic profile of *Blastocystis* species in Saint Petersburg residents with gastrointestinal tract diseases in different age groups. *Med Parazitol (Mosk).* 4:19-23
- Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG (1996). Human parasite finds taxonomic home. *Nature.* 380:398
- Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH (1995). Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 81: 446-450

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Singh M, Ho LC, Yap ALL, Ng GC, Tan SW, Moe KT, Yap EH (1996). Axenic culture of reptilian *Blastocystis* isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitol Res.* 82: 165–169
- Sinniah B, Sabaridah I, Soe MM, Sabitha P, Awang IP, Ong GP, Hassan AK (2012). Determining the prevalence of intestinal parasites in three Orang Asli (Aborigines) communities in Perak, Malaysia. 29:200-206
- Snowden K, Logan K, Blozinski C, Hoevers J, Holman P (2000). Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis* isolates from animal hosts. *Parasitol Res.* 86: 62–66
- Souppart L, Sanciu G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E, Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E (2009). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res.* 105: 413-421
- Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Delbac F, Boorom K, Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E. (2010). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res.* 106(2):505–511.
- Spanakos G, Papadogiannakis E, Kontos VI, Menounos P, Velonakis E, Koutis C, Vakalis NC (2011). Molecular screening for *Blastocystis* sp. in canine faecal samples in Greece. *J Hell Vet Med Soc.* 62: 216–220
- Speich B, Marti H, Ame SM, Ali SM, Bogoch II, Utzinger J, Keiser J (2013). Prevalence of intestinal protozoa infection among school-aged children on Pemba Island, Tanzania, and effect of single-dose albendazole, nitazoxanide and albendazole-nitazoxanide. *Parasit Vectors* 6:3
- Stark D, van Hal S, Marriott D, Elis J, Harkness J (2007). Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol.* 37:11–20
- Stark D, Roberts T, Ellis JT, Marriott D, Harkness J (2013). Evaluation of the EasyScreen™ Enteric Parasite Detection Kit for the detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba* complex, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 78:149-152
- Stensvold CR (2013a). *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical Parasitology.* 3: 26–34
- Stensvold CR (2013b). Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *J Clin Microbiol.* 51(1): 190–194.
- Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC (2006). Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol.* 92: 1081-1087

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG (2007a). Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus. *Trends Parasitol.* 23: 93-96
- Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV (2007b). Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 59: 303-307.
- Stensvold CR, Arendrup MC, Nielsen HV, Bada A, Thorsen S (2008). Symptomatic infection with *Blastocystis* sp. subtype 8 successfully treated with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Ann Trop Med Parasitol.* 102: 271-274.
- Stensvold, CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG (2009a). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol.* 39: 473–479
- Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KE, Arendrup MC, Nielsen HV, Molbak K (2009b). *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect.* 137:1655-1663
- Stensvold CR, Smith HV, Nagel R, Olsen KE, Traub RJ (2010). Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: reality or delusion? *J Clin Gastroenterol.* 44: 85-90.
- Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KE, Nielsen HV (2011). *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg.* 84:883-885
- Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen LO, Nielsen HV (2012a). Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of Clinical Microbiology.* 50: 1847–1851
- Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG (2012b). Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol.* 12:263-273
- Stenzel DJ, Boreham PFL (1991). A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol.* 21:613–615
- Stenzel DJ, Boreham PFL (1996). *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev.* 9:563–584
- Stenzel DJ, Boreham PF, McDougall R (1991). Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *Int J Parasitol.* 21:807–812
- Stenzel DJ, Cassidy MF, Boreham PFL (1993). Morphology of *Blastocystis* sp. from circus animals, *Int J Parasitol.* 23:685-687
- Stenzel DJ, Cassidy MF, Boreham PFL (1994). Morphology of *Blastocystis* sp. from domestic birds. *Parasitol Res.* 80: 131–137

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Stenzel DJ, Lee MG, Boreham PFL (1997). Morphological differences in *Blastocystis* cysts—an indication of different species? *Parasitol Res.* 83:452–457
- Suresh K, Ng GC, Ramachandran NP, Ho LC, Yap EH, Singh M (1993). In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 79: 456-460
- Suresh K, Howe J, Chong SY, Ng GC, Ho LC, Loh AK, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M (1994). Ultrastructural changes during in vitro encystment of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 80: 327-335
- Suresh K, Mak JW, Chuong LS, Ragunathan T, Init I (1997). Sac-like pouches in *Blastocystis* from the house lizard *Cosymbotus platyurus*. *Parasitol Res.* 83:523–552
- Suresh K, Smith H (2004). Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis: Off Pub Eur Soc Clin Microbiol.* 23:509–511
- Suresh K, Smith HV, Tan TC (2005). Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Appl Environ Microbiol.* 71: 5619– 5620
- Suresh K, Venilla GD, Tan TC, Rohela M (2009). In vivo encystation of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 104: 1373-1380
- Tai WP, Hu PJ, Wu J, Lin XC (2011). Six ulcerative colitis patients with refractory symptoms co-infective with *Blastocystis hominis* in China. *Parasitol Res.* 108:1207–1210
- Takizawa Md, Falavigna DL, Gomes ML (2009). Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 51:31-35
- Tan KSW (2004). *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol.* 126:121–144
- Tan KSW (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 21:639–665
- Tan KSW, Stenzel DJ (2003). Multiple reproductive processes in *Blastocystis*: proceed with caution. *Trends Parasitol.* 19: 290–291
- Tan KSW, Ng GC, Quek E, Howe J, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M (2000). *Blastocystis hominis*: a simplified and high- efficiency method for clonal growth on solid agar. *Exp Parasitol.* 96:9–15
- Tan KSW, Singh M, Yap EH (2002). Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *Int J Parasitol.* 32: 789-804
- Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, Wu B, MacAry PA (2010). Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep.* 12:28–35

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Tan SW, Singh M, Thong KT, Ho LC, Moe KT, Chen XQ, Ng GC, Yap EH (1996a). Clonal growth of *Blastocystis hominis* in soft agar with sodium thioglycollate. *Parasitol Res.* 82:737–739
- Tan SW, Singh M, Yap EH, Ho LC, Moe KT, Howe J, Ng GC (1996b). Colony formation of *Blastocystis hominis* in soft agar. *Parasitol Res.* 82:375–377
- Tan TC, Suresh KG (2006a). Amoeboid form of *Blastocystis hominis*-a detailed ultrastructural insight. *Parasitol Res.* 99:737–742
- Tan TC, Suresh KG (2006b). Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res.* 98:189–193
- Tan TC, Suresh KG (2007). Evidence of plasmotomy in *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 101:1521–1525
- Tan TC, Suresh KG, Thong KL, Smith HV (2006). PCR fingerprinting of *Blastocystis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts. *Parasitol Res.* 99:459–465
- Tan TC, Ong SC, Suresh KG (2009). Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitol Res.* 105:1283–1286
- Tan TC, Tan PC, Sharma R, Sugnaseelan S, Suresh KG (2013). Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia. *Parasitol Res.* 112:85–89
- Tandukar S, Ansari S, Adhikari N, Shrestha A, Gautam J, Sharma B, Rajbhandari D, Gautam S, Nepal HP, Sherchand JB (2013). Intestinal parasitosis in school children of Lalitpur district of Nepal. *BMC Res Notes.* 6:449
- Tanizaki A, Yoshikawa H, Iwatani S, Kimata I (2005). Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. *Parasitol Res.* 96: 57–61
- Taşova Y, Sahin B, Koltas S, Paydas S (2000). Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. *Acta Med Okayama;* 54:133–136
- Teo JD, Macary PA, Tan KS (2014). Pleiotropic effects of *Blastocystis* spp. Subtypes 4 and 7 on ligand-specific toll-like receptor signaling and NF-κB activation in a human monocyte cell line. *PLoS One.* 14;9:e89036
- Teow WL, Zaman V, Ng GC, Chan YC, Yap EH, Howe J, Gopalakrishnakone P, Singh M, (1991). A *Blastocystis* species from the sea-snake *Lapemis hardwickii* (Serpentes: Hydrophiidae). *Int J Parasitol.* 21: 723–726
- Teow WL, Ng GC, Chan PP, Chan YC, Yap EH, Zaman V, Singh M (1992). A survey of *Blastocystis* in reptiles. *Parasitol Res.* 78:453–455



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, Mungthin M (2004). The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Res.* 93: 445-447
- Thanikachalam MP, Kasemsuk Y, Mak JW, Sharifah Emilia TS, Kandasamy P.(2008). A study of parasitic infections in the luminal contents and tissue sections of appendix specimens. *Trop Biomed.* 25(2):166–172.
- Thathaisong U, Siripattanapipong S, Mungthin M, Pipatsatitpong D, Tan-Ariya P, Naaglor T, Leelayoova S (2013). Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the home for girls, Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 88: 352-358
- Tian LG, Chen JX, Wang TP, Cheng GJ, Steinmann P, Wang FF, Cai YC, Yin XM, Gio J, Zhou L, Zhou XN (2012). Co-infection of HIV and intestinal parasites in rural area of China. *Parasit Vectors.* 5: 36
- Tian LG, Wang TP, Lv S, Wang FF, Guo J, Yin XM, Cai YC, Dickey MK, Steinmann P, Chen JX (2013). HIV and intestinal parasite co-infections among a Chinese population: an immunological profile. *Infect Dis Poverty.* 23: 2:18
- Tligui H, Oudghiri M, Bahji M, Agoumi A (2002). Données épidémiologique et pathologiques sur *Blastocystis hominis*. *Revue Marocaine de Biologie-Infestologie.* 10 : 13-18
- Trabelsi S, Ben Haj Ali I, Khalid S (2010). Caractéristiques épidémiologiques et cliniques de *Blastocystis hominis*. *Tunis Med.* 88 :190-192
- Tsang TK, Levin BS, Morse SR (1989). Terminal ileitis with *Blastocystis hominis* infection. *Am J Gastroenterol.* 84:798–799
- Turgay N, Unver-Yolasıǧmaz A, Oyur T, Bardak-Özdemir S, Töz S (2012). Monthly distribution of intestinal parasites detected in a part of western Turkey between May 2009-April 2010-results of acid fast and modified trichrome staining methods. *Turkiye Parazitol Derg.* 36:71-74
- Upcroft JA, Dunn LA, Dommett LS, Healey A, Upcroft P, Boreham PFL (1989). Chromosomes of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol.* 19: 879–883
- Valido EM, Rivera WL (2007). Colony growth of Philippine isolates of *Blastocystis hominis* in simplified, soft agar medium. *Parasitol Res.* 101:213–7
- Valsecchi R, Leghissa P, Greco V (2004). Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection. *Acta Derm Venereol.* 84:322–323
- Van Hellemond JJ, Molhoek N, Koelewijn R, Wismans PJ, van Genderen PJJ (2012). Is paromomycin the drug of choice for eradication of *Dientamoeba fragilis* in adults? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2:162–165

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Vassalos CM, Spanakos G, Vassalou E, Papadopoulou C, Vakalis N (2010). Differences in clinical significance and morphologic features of *Blastocystis* sp subtype 3. *Am J Clin Pathol*. 133: 251–258
- Vdovenko AA (2000). *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitol Res*. 86:8-10
- Velasco J, Gonzalez F, Diaz T, Pena-Guillen J, Araque M (2011). Profiles of enteropathogens in asymptomatic children from indigenous communities of Merida, Venezuela. *J Infect Dev Ctries*. 5:276–285
- Vennila GD, Kumar GS, Anuar AK, Rajah S, Saminathan R, Sivanandan S, Ramakrishnan K (1999). Irregular shedding of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 85:162–164
- Verma R, Delfanian K (2013). *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *Am J Med Sci*. 346: 80-81
- Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzen A, Stopsack K, Heinrich-Grafe U, and Pohlmann C (2010). *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol Int* 59: 469-471
- Wang KX, Li CP, Wang J, Cui YB (2002). Epidemiological survey of *Blastocystis hominis* in Huainan City, Anhui Province, China. *World J Gastroentero*. 18:928-932
- Wang W, Cuttall L, Bielefeldt-Ohmann H, Inpankaew T, Owen H, Traub RJ (2013). Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasite Vectors* 24:6–215
- Wang W, Cuttall L, Traub RJ, Owen H, Bielefeldt-Ohmann H (2014). Characterisation of the *Blastocystis* specific faecal IgA immune response in pigs. *Parasite Immunol*. doi:10.1111/pim.12123
- Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Meloni D, Texier C, Delbac F, El Alaoui H (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite : an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis*. 5:167-178
- Wawrzyniak I, Roussel M, Diogon M, Couloux A, Texier C, Tan KS, Vivares CP, Delbac F, Wincker P, and El Alaoui H (2008). Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol*. 38: 1377- 1382
- Wawrzyniak I, Texier C, Poirier P, Viscogliosi E, Tan KS, Delbac F, El Alaoui H (2012). Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasitol Int*. 61:437–442
- WHO (2008). Guidelines for Drinking-water Quality, 3rd ed. Incorporating the first and second addenda. Geneva: 514



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Windsor J (2007). *D. fragilis* and *B. hominis*: neglected human protozoa. *Biomed Sci* 51:524–527
- Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SK, Whiteside TM (2002). Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *Br J Biomed Sci* 59:154–157
- Wong KHS, Ng GC, Lin RTP, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KSW (2008). Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology Research*. 102: 663–670
- Wu B, Yin J, Texier C, Roussel M, Tan KSW (2010). *Blastocystis* legumain is localized on the cell surface, and specific inhibition of its activity implicates a pro-survival role for the enzyme. *J Biol Chem*. 285:1790–1798
- Wu G, Yishu X, Gaolu C, Guangming LML, Jinglin Z (2000). Investigation of an epidemic outbreak of blastocystiasis. *Chin J Parasitol Dis Control*. 13: 25
- Wu Z, Mirza H, Teo JD, Tan KS (2014a). Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *Biomed Res Int*. 2014:209163.
- Wu Z, Mirza H, Tan KS (2014b). Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. *PLoS Negl Trop Dis*. 8:e2885.
- Yaicharoen R, Ngrenngarmmlert W, Wongjindanon N, Sripochang S, Kiatfuengfoo R (2006). Infection of *Blastocystis hominis* in primary schoolchildren from Nakhon Pathom province, Thailand. *Trop Biomed*. 23:117–122
- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R (2010a). Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 106: 1033-1038
- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R (2010b). *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res*. 107:679-684
- Yakoob J, Jafri W, Jafri N, Khan R, Islam M, Beg MA, Zaman V (2004). Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *Am J Trop Med Hyg*. 70: 383- 385
- Yamada M, Yoshikawa H, Tegoshi T, Matsumoto Y, Yoshikawa T, Shiota T, Yoshida Y (1987). Light microscopical study of *Blastocystis* spp. in monkeys and fowls. *Parasitol Res*. 73:527–531

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Yamamoto-Furusho JK, Torijano-Carrera E (2010). Intestinal Protozoa Infections among Patients with Ulcerative Colitis: Prevalence and Impact on Clinical Disease Course. *Digestion* 82: 18–23
- Yaman O, Yazar S, Ozcan H, Cetinkaya U, Gözkeç N, Ateş S, Sahin I (2008). Distribution of intestinal parasites in patients presenting at the parasitology laboratory of the medical school of Erciyes University between the years of 2005 and 2008 *Turkiye Parazitol Derg.* 32:266-270
- Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo X, Chen G (2006). Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol Res.* 99: 597-601
- Yan Y, Su S, Ye J, Lai X, Lai R, Liao H, Chen G, Zhang R, Hou Z, Luo X (2007). *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitol Res.* 101:1527–1532
- Yılmaz H, Taş-Cengiz Z, Ceylan A, Ekici A (2012). The distribution of intestinal parasites in people admitted to the Yüzüncü Yıl University Parasitology Laboratory of Health Research and Training Hospital, in 2009. *Turkiye Parazitol Derg.* 36:105-108
- Yoshikawa H, Hayakawa A (1996a). Morphological changes in the central vacuole of *Blastocystis hominis* during in vitro culture. *Protoplasma.* 194:63–68
- Yoshikawa H, Hayakawa A (1996b). Freeze-fracture cytochemistry of membrane cholesterol in *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol.* 26:1111–1114
- Yoshikawa H, Yamada M, Yoshida Y (1988). Freeze-fracture study of *Blastocystis hominis*. *J Protozool.* 35:522–528
- Yoshikawa H, Kuwayama N, Enose Y (1995). Histochemical detection of carbohydrates of *Blastocystis hominis*. *J Eukaryot Microbiol.* 42:70–74
- Yoshikawa H, Nagono I, Yap EH, Singh M, Takahashi Y (1996). DNA polymorphism revealed by arbitrary primers polymerase chain reaction among *Blastocystis* strains isolated from humans, a chicken, and a reptile. *J Eukaryot Microbiol.* 43: 127-130
- Yoshikawa H, Nagano I, Wu Z, Yap EH, Singh M, Takahashi Y (1998). Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype- specific diagnostic primers. *Mol Cell Probes.* 12: 153-159
- Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y (2000). Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *J Clin Microbiol.* 38:1324–1330
- Yoshikawa H, Nagashima M, Morimoto K, Yamanouti Y, Yap EH, Singh M (2003a). Freeze-fracture and cytochemical studies on the in vitro cyst form of reptilian *Blastocystis pythoni*. *J Eukaryot Microbiol.* 50:70–75

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Yoshikawa H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y (2003b). Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *J Parasitol.* 89:585–594
- Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I (2004a). Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol Res.* 94: 391-396
- Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IK, Hossain MB, Zaman V, Haque R, Takahashi Y (2004b). Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res.* 92:22–29
- Yoshikawa H, Abe N, Wu Z (2004c). PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology.* 150:1147-1151
- Yoshikawa H, Morimoto K, Nagashima M, Miyamoto N (2004d). A survey of *Blastocystis* infection in anuran and urodele amphibians. *Vet Parasitol.* 122:91-102.
- Yoshikawa H, Wu Z, Howe J, Hashimoto T, Geok-Choo NG, Tan KS W (2007). Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *J Eukaryot Microbiol.* 54:33–37
- Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, Kanbara H (2009). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol.* 160:295–300
- Zaki M, Zaman V, Sheikh NA (1996). Resistance of *Blastocystis hominis* cysts to chlorine. *J Pak Med Assoc.* 46: 178–179
- Zaman V (1996). *Blastocystis hominis*. In: Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrell D (eds). *Oxford textbook of medicine* (3rd ed). Oxford University Press, Oxford, p 887
- Zaman V (1997). Phase-contrast microscopy of cell division in *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol.* 91:223–224
- Zaman V, Khan KZ (1994). A concentration technique for obtaining viable cysts of *Blastocystis hominis* from faeces. *J Pak Med Assoc.* 44:220-221
- Zaman V, Ng GC, Suresh K, Yap EH, Singh M (1993). Isolation of *Blastocystis* from the cockroach (Dictyoptera: Blattidae). *Parasitol Res.* 79:73–74
- Zaman V, Howe J, Ng M (1997). Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 83: 306-308
- Zaman V, Howe J, Ng M (1998). Scanning electron microscopy of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol Res.* 84: 476-477
- Zaman V, Howe J, Ng M, Goh TK (1999). Scanning electron microscopy of the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 85:974–976

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC (2007). Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. *Parasitol Res.* 101:43–51
- Zhang X, Zhang S, Qiao J, Wu X, Zhao L, Liu Y, Fan X (2012). Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 110:1165–1172
- Zhou XB, Zhang X, Qiao JY, Cai J, Cheng S, Yuan Y, Li J (2010). Encystation-survival of *Blastocystis hominis* in immunocompetent mice abdomen cavity. *Parasitol Res.* 106:1315–1320.
- Zierdt CH, Rude WS, Bull BS (1967). Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *Am J Clin Pathol.* 48(5): 495–501
- Zierdt CH (1973). Studies of *Blastocystis hominis*. *J Protozool.* 20:114–121
- Zierdt CH (1988). *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. *Parasitol Today.* 4:15–17
- Zierdt CH (1991). *Blastocystis hominis*-past and future. *Clin Microbiol Rev.* 4:61–79
- Zierdt CH, Tan HK (1976). Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. *Z Parasitenkd.* 50:277–283
- Zierdt CH, Williams RL (1974). *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. *Exp Parasitol.* 36: 233–243
- Zierdt CH, Donnelly CT, Muller J, Constantopoulos G, (1988). Biochemical and ultrastructural study of *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol.* 26: 965–970
- Zuckerman MJ, Watts MT, Ho H, Meriano FV (1994). *Blastocystis hominis* infection and intestinal injury. *Am J Med Sci.* 308: 96–101
- Zuel-Fakkar NA, Hameed D, Hassanin O (2011). Study of *Blastocystis hominis* isolates in urticaria: a case-control study. *Clin Exp Dermatol.* 36: 908–910
- Zumaquero-Ríos JL, Sarracent-Pérez J, Rojas-García R, Rojas-Rivero L, Martínez-Tovilla Y, Valero MA, Mas-Coma S (2013). Fascioliasis and intestinal parasitoses affecting schoolchildren in Atlixco, Puebla State, Mexico: epidemiology and treatment with nitazoxanide. *PLoS Negl Trop Dis.* 21:7:e2553

# *Annexes*

---

## ANNEXES

**Annexe 1 :** Questionnaire standardisé relatif à la notification des cas de blastocystose au Liban.

### Recherche de *Blastocystis sp* à visée scientifique

Nom de laboratoire: .....

PBR : .....

1. Nom, prénom du patient: .....

2. Age: .....

3. Sexe: M ☐ F ☐

4. Profession: .....

5. Résidence: .....

6. Le patient est-il en contact avec des animaux (de compagnie ou de ferme): Oui ☐ Non ☐

7. Le patient a-t-il voyagé hors du Liban (< 1ans)? Oui ☐ Non ☐

Si oui, quand et dans quel pays? .....

8. Nature de l'eau consommée : Puit ☐ Robinets ☐ Minérale ☐ Autres.....

9. Le patient est-il immunodéprimé? Oui ☐ Non ☐

Si oui, quelle est la cause?

☐ VIH

☐ Immunosuppresseurs

☐ Autres

10. Parmi les symptômes suivants, lesquels sont présents?

☐ Douleurs abdominales

☐ Diarrhée

☐ Constipation

☐ Douleur articulaire

☐ Rash cutané

☐ Aucun

Autres:.....

11. S'il est diarrhéique, quel est le nombre des selles émis par jour ? .....

12. Le patient souffre-t-il d'une colopathie fonctionnelle (Syndrome de l'intestin irritable) ?

☐ Oui

☐ Non

13. Quand les symptômes ont-ils commencés : .....

14. Le patient présente-t-il d'autres pathologies/parasitoses (amibes, *Giardia*) pouvant entraîner cette symptomatologie : Non ☐ Oui ☐ lequel : .....

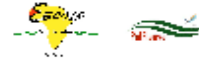
# ANNEXES

## Annexe 2 : Questionnaire standardisé relatif à la notification des cas de blastocystose au Sénégal.

Identifiant :

\_\_\_\_\_ P3V

### Questionnaire enfant (P3V : Octobre 2011-Etude Schisto-VAN)



Village ☐ A ☐ F ☐ N Date \_\_\_\_/oct/2011 Heure : ..... Enquêteur ..... T. ext .....°C  
 Prénom ..... Nom ..... ☐ Fille ☐ Garçon  
 Père ..... Mère ..... Ecole, Classe : .....  
 Date de Naissance ...../...../..... Âge ..... Température auriculaire \_\_\_\_ , \_\_\_\_ °C  
 Qui a répondu ? ..... Lien à l'enfant ..... N° concession ..... Chef .....  
 Liens de parenté avec d'autres enfants de l'étude ? .....  
 Partage l'habitation avec certains de ces enfants ? ☐ oui ☐ non lesquels ? .....

	Oui	Non	Quand	Durée	Traitement
Fièvre récente					
Paludisme récent					
Toux de plus que 3 semaines					
Diarrhée					
Vomissements					
Autres maladies					

Hématurie ? ☐ oui ☐ non Maux de ventre ? ☐ oui ☐ non Douleurs à la miction ? ☐ oui ☐ non  
 Baignade régulière dans le fleuve ou canaux d'irrigation ☐ oui ☐ non Fréquence ? .....  
 Heure ? ..... Durée ? ..... Traitement au PZQ ? ☐ oui ☐ non Quand ? .....  
 Remarques ? .....  
 Voyage ? ☐ oui ☐ non Où ? ..... Durée ? ..... Il y a combien de temps ? .....

Observations relatives aux urines : .....

Observations relatives aux selles: .....

Taux d'hémoglobine : \_\_\_\_\_ g/dl Taille 1 : ..... (cm) Taille 2 : ..... (cm) Poids: ..... (Kg)

Carnet de vaccination : ☐ oui ☐ oui mais manquant ☐ non Complètement vacciné ☐ oui ☐ non

BCG ..... Penta 1 ..... Penta 2 ..... Penta 3 ..... Var-VAA .....

Observations : .....

### Annexe 3 : Questionnaire standardisé relatif à la notification des cas de blastocystose en France

<b>Identification du laboratoire déclarant ou Enregistrement Labo</b>	<b>N°</b>	<b>Nom &amp; Tél. du contact :</b>  <b>Nom :</b>  <b>Tel :</b>
<b>N° Inclusion du Patient :</b>	<b>Date du prélèvement :</b>  <i>(JJ/MM/AA)</i>	

\_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

*Veillez indiquer dans l'ordre:*

- *Votre code de laboratoire à 3 lettres*
- *L'année du prélèvement (4 chiffres)*
- *Le mois du prélèvement (2 chiffres)*
- *Les trois premières lettres du nom du patient*
- *Les deux premières lettres du prénom du patient*
- *Le numéro du prélèvement: 1 pour le premier prélèvement, 2 pour le deuxième etc.*

**Sexe:** ☐ M ☐ F

**Date de naissance :**

A défaut, âge :

**Profession :**

Animaux de compagnie : Non ☐ Oui : ☐

Si oui lesquels :

**Voyages récents (<1 an) :** Non ☐ Oui : ☐

Si oui quels continents :

**Aspect des selles :** ☐ Selles liquides, ☐ molles, ☐ moulées, ☐ dures

Statut immunitaire : 1 : ☐ 2 : ☐ 3 : ☐ 4 : ☐ 5 : ☐ 6 : ☐ Autres =



## ANNEXES

---

☐ Numération CD4 :

Sérologie HIV positive = 1 / Transplantation = 2 / Immunosuppresseur = 3 / Greffe de moelle osseuse = 4 / Pas de problème connu = 5

---

Présence de *Blastocystis* à l'examen direct : ☐ Non ☐ Oui

Symptomatologie : ☐ Non ☐ Oui

Date de début des symptômes :

(JJ/MM/AA)

☐ Douleurs abdominales ☐ Douleurs articulaires ☐ Ballonnements abdominaux

☐ Diarrhée ☐ Constipation ☐ Rush cutané

☐ Asthénie ☐ Aucun symptôme ☐ Autres, préciser : -----

-Le patient souffre-t-il d'une colopathie fonctionnelle ? Non ☐ Oui : ☐

(Syndrome de l'intestin irritable).

-Le patient présente-t-il d'autres pathologies/parasitoses (amibes, *Giardia*, bactéries, ...) pouvant entraîner cette symptomatologie ? Non ☐ Oui : ☐

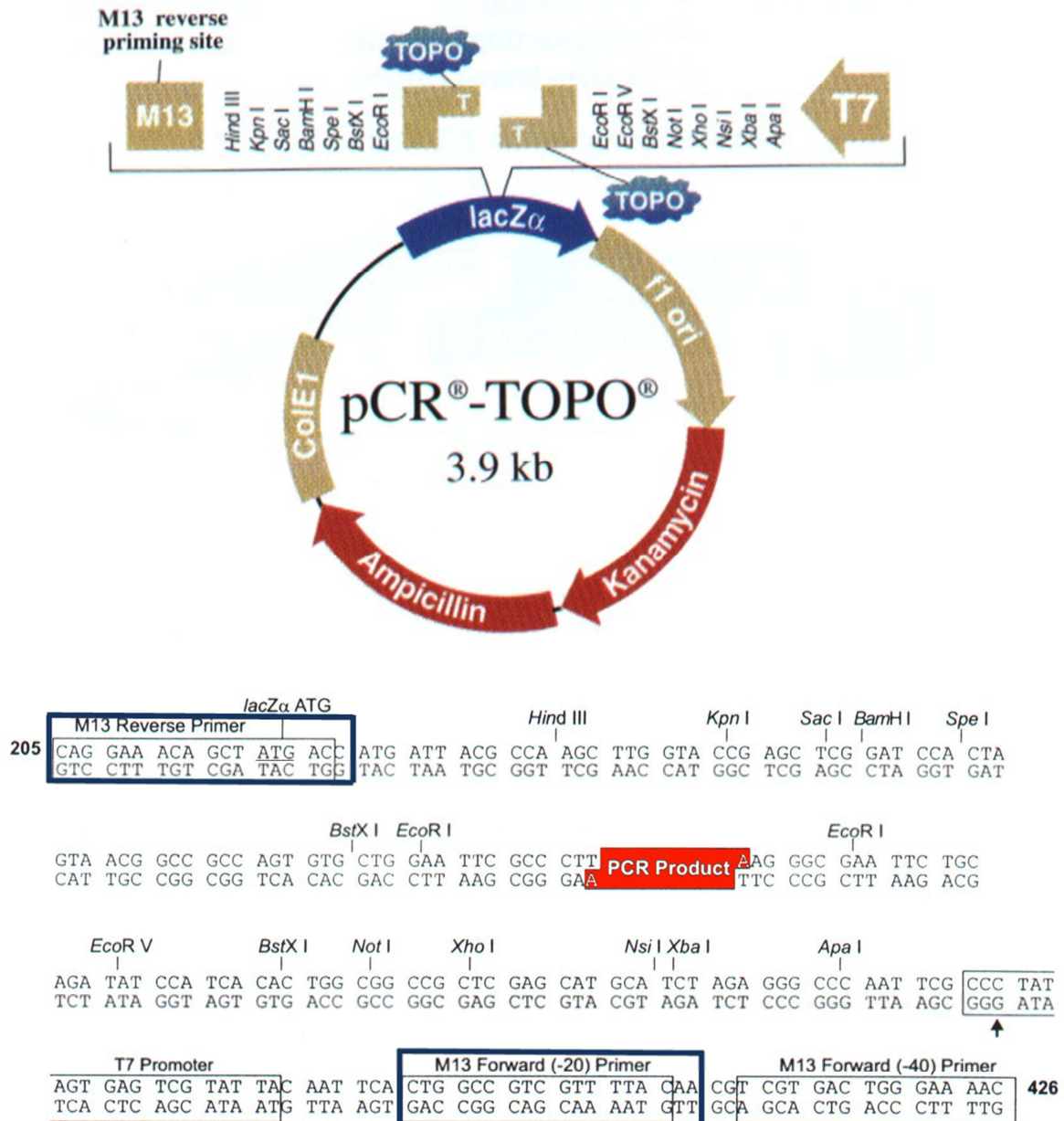
Si oui, préciser :

---

## ANNEXES

**Annexe 4 :** Vecteur pCR 2.1-TOPO, carte de restriction du polylinker inclus dans le plasmide et site de clonage de l'insert.

TOPO représente la topoisomérase I liée de façon covalente au niveau du site d'insertion. Les amorces M13 Forward et M13 Reverse utilisées pour le séquençage sont encadrées en bleu. A noter les deux sites *EcoRI* qui encadrent le produit de PCR cloné.



## Annexe 5 : Synthèse des données enregistrées concernant les échantillons de primates.

Numero de pot	Classe	Ordre	Famille	Espèce	Nom commun de l'animal	Nom du secteur de Zoo	Nb. d'individus dans le lieu de prélevement	Nb. de pots par espèce	Selles individualisés (0) ou mélange de selles (M)	Remarques	ST	Blasto	% identité avec le 1er résultat blasin
P1						Grands singes				mâle 24 ans cage 1	S12		99%
P2						Grands singes				mâle 24 ans cage 2	S11		99%
P3						Grands singes		6		enfant cage 2	S15		100%
P4						Grands singes				jeune mâle + enfant cage 1	S16		99%
P5						Grands singes				jeune mâle + enfant cage 2	ng		ng
P6						Grands singes				mâle	ng		ng
P7						Grands singes				jeune 22 ans	S15		99%
P8						Grands singes		4		jeune 37 ans cage 1	S15		99%
P9						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S12		99%
P10						Grands singes		9		jeune 37 ans cage 1	S12		100%
P11						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	ng		ng
P12						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S15		99%
P13						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	ng		ng
P14						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S12		100%
P15						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S12		100%
P16						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P17						Grands singes		2		jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P18						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	ng		ng
P19						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S14		100%
P20						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		99%
P21						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S14		99%
P22						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S12		100%
P23						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S12		99%
P24						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	ng		ng
P25						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S14		99%
P26						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S14		100%
P27						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P28						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P29						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P30						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P31						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P32						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P33						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P34						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P35						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P36						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P37						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P38						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P39						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P40						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P41						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P42						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P43						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P44						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P45						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P46						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P47						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P48						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P49						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P50						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P51						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P52						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P53						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P54						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P55						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P56						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P57						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P58						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P59						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P60						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P61						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P62						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P63						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P64						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P65						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P66						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P67						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P68						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P69						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P70						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P71						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P72						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P73						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P74						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P75						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P76						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P77						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P78						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P79						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P80						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P81						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P82						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P83						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P84						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P85						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P86						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P87						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P88						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P89						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P90						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P91						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P92						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P93						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P94						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P95						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P96						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P97						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P98						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P99						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P100						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P101						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P102						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P103						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P104						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P105						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P106						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P107						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P108						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P109						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P110						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P111						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P112						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P113						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P114						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P115						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P116						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P117						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P118						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P119						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P120						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P121						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P122						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P123						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P124						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P125						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P126						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P127						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P128						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P129						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P130						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P131						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P132						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P133						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P134						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P135						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P136						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P137						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P138						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P139						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P140						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P141						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P142						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P143						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%
P144						Grands singes				jeune 37 ans cage 1	S11		100%

# ANNEXES

Numero de pot	Classe	Ordre	Famille	Espèce	Nom commun de l'animal	Nom du secteur du Zoo	Nb. d'individus dans le lieu du prélèvement	Nb. de pots par espèce	Selles individualisées (I) ou mélange de selles (M)	Remarques	ST Blast	% identité avec le 1er résultat blast		
M1	Mammalia	Cetartiodactyla	Hippopotamidae	<i>Hippopotamus amphibius</i>	Hippopotame	Singapote	1	1	I	pot femelle, prélèvement réalisé par le soigneur	inf. miste			
M9						grafe	Singapote	5	3	I	pot jeune, prélèvement réalisé par le soigneur	ST14	96%	
M10						grafe	Singapote			I	pot mâle, prélèvement réalisé par le soigneur	ST14	96%	
M11						grafe	Singapote			I	grafe vieille femelle	inf. miste		
M12						grafe	Singapote	5	3	I	grafe jeune femelle	ST14	96%	
M13						grafe	Singapote			I	grafe mâle	inf. miste		
M14						grafe	Singapote			I	mélange 1	inf. miste		
M15						Alpaga	Forêt			M	mélange 2	inf. miste		
M16						Alpaga	Forêt	8	5	M	mélange 3	inf. miste		
M17						Alpaga	Forêt			M	mélange 4	inf. miste		
M18			Camelidae	<i>Neotoma pusillus</i>	Alpaga	Forêt			M	mélange 5	inf. miste			
M19					Alpaga	Forêt			M	mélange 6	inf. miste			
M2					bebe chèvres		7	3	M	mélange écrit 1 selles mélangées	inf. miste			
M3					bebe chèvres		7		M	mélange écrit 2 selles mélangées	inf. miste			
M4					bebe chèvres				M	mélange écrit 3 selles mélangées	inf. miste			
M5					Chèvre	Forêt	10	3	M	mélange écrit 2	inf. miste			
M6					Chèvre	Forêt			M	mélange écrit 3	inf. miste			
M7					Chèvre	Forêt			M	adultes ???	inf. miste			
M8					chèvre adultes	Forêt	7	1	M	adultes (Enclos 10 femelles, 1 mâle et 1 jeune n	ST10	99%		
M20					Plaine Africaine		12	2	M	femelles (Enclos 10 femelles, 1 mâle et 1 jeune	ST10	99%		
M21			Koudou		2	1	M	2 femelles	ST10	99%				
M22			Bongo		13	1	M		ST14	97%				
M23			Grouse				M		ST10	99%				
M33			Bovidae	<i>Ovis beisa</i>	Ovis beisa (ou d'Afrique de l'Est)	Forêt	2	2	M	2 femelles, échantillon miste	ST10	99%		
M34					Ovis beisa (ou d'Afrique de l'Est)	Forêt	2	1	M	2 femelles, échantillon miste	ST10	99%		
M35					Ovis beisa (ou d'Afrique de l'Est)	Rhinoceros	7	1	M	selles mélangées, 2 femelles	ST10	99%		
M41					Ovis beisa (ou d'Afrique de l'Est)	Singapote	1	1	M	selles mélangées, 2 femelles	inf. miste			
M36					Ovis algaizelle	Rhinoceros	1	1	I	1 mâle	ST10	99%		
M37					Ovis algaizelle	Forêt	1	1	I		ST10	99%		
M38					Ovis algaizelle	Tapir	5	3	I	Echantillons individualisés	ST10	99%		
M39					Ovis algaizelle	Tapir			I	Echantillons individualisés	ST10	99%		
M40					Ovis algaizelle	Bleu de France	4	1	M	Echantillons individualisés	inf. miste			
M42					Bleu de France	Impalas	7	1	M	4 femelles	inf. miste			
M43			Equidae	<i>Danalisia paggus</i> <i>Aspiceros melampus</i> <i>Bos bos</i>	Plaine Africaine	Forêt			M	échantillon individualisé, inf. femelle 1	inf. miste			
M44					Bleu de France	Forêt	4	3	M	échantillon individualisé, inf. femelle 2	inf. miste			
M45					Bleu de France	Bleu de France			M	échantillon individualisé, inf. mâle	inf. miste			
M46					Bleu de France	Bleu de France			M	pot avec une femelle, 5 femelles 1 mâle	ST13	99%		
M24					Zibrou de plaines	Plaine Africaine	6	2	I	pot avec une femelle, 5 femelles 1 mâle	ST13	99%		
M25					Zibrou de plaines	Plaine Africaine			M	mélange de 2 adultes (1 mâle et 1 femelle)	inf. miste			
M26					Zibrou de grey	Rhinoceros	4	2	M	mélange de 2 petits	inf. miste			
M27					Zibrou de grey	Rhinoceros			M	mélange écrit 1	ST13	99%		
M29					Baudet du pottou	Forêt	2	2	M	mélange écrit 2	inf. miste			
M30					Baudet du pottou	Forêt			M	1 mâle, 1 femelle, 1 enfant pas de selles du bé	ST13	99%		
M31			Rhinocerosidae	<i>Ceratotherium simum</i>	Rhinoceros	3	1	M	échantillon individualisé, inf. écrit 1	inf. miste				
M32			Tapidae	<i>Tapirus terrestris</i>	Tapir	3	2	M	échantillon individualisé, inf. écrit 2	ST13	100%			
M32														
TOTAL DE POTS							46							
TOTAL ESPECES						CERTARTIODACTYLA		12						
TOTAL ESPECES						PERISSODACTYLA		5						

ANNEXES

Numero de pot	Classe	Ordre	Famille	Espèce	Nom commun de l'animal	Nom du secteur du Zoo	Nb. D'animaux dans le lieu du prélèvement	Nb. de pots par espèce	Selles individualisées (I) ou mélange de selles (M)	Remarques	ST Blaeto	% identité avec le 1er résultat blasin	
C11	Mammalia	Carnivora	Canidae	<i>Canis lupus occidentalis</i>	Loup de Mackenzie	Faiverie	5	4		écrit 1 ind	ST3	98%	
C12					Loup de Mackenzie	Faiverie				écrit 2 ind	nsq		
C13					Loup de Mackenzie	Faiverie				écrit 3 ind	nsq		
C14					Loup de Mackenzie	Faiverie				écrit 4 ind	nsq		
C15				<i>Lycan pictus</i>	Lycan	Faiverie	3	3		écrit 1 ind	nsq		
C16					Lycan	Faiverie				écrit 2 ind	nsq		
C17					Lycan	Faiverie				écrit 3 ind	nsq		
C18					Fennec	Forêt	3	2		écrit 1 ind	nsq		
C28				Fennec	Forêt	écrit 2 ind				nsq			
C29				<i>Vulpes zibet</i>	Fennec	Forêt		5		male mélange 1 (dans endlos 3M+3F)	nsq		
C30					Fennec	Forêt				male mélange 2 (dans endlos 3M+3F)	nsq		
C31					Fennec	Forêt				female mélange 3 (dans endlos 3M+3F)	nsq		
C32					Fennec	Forêt	female mélange 4 (dans endlos 3M+3F)			nsq			
C33					Fennec	Forêt	female mélange 5 (dans endlos 3M+3F)			nsq			
C34			Fennec		Forêt				nsq				
C1			Felidae	<i>Lynx lynx</i>	Lynx d'Eurasie	Lions	1	1		Echantillon de lion male	nsq	100%	
C2					Lion	Lions	4	1		écrit 1	nsq		
C6				<i>Acinonyx jubatus</i>	Guepard cheetah	Faiverie	8	3		écrit 2	ST2		
C7					Guepard cheetah	Faiverie				écrit 3	nsq		
C8					Guepard cheetah	Faiverie					nsq		
C9					Guepard cheetah	Faiverie		1		Echantillon individualisé mâle	nsq		
C10					Guepard	Faiverie				écrit 1 ind	nsq		
C19				<i>Panthera pardus kotiya</i>	Panthere de Sri Lankan	Faiverie	2	2		écrit 2 ind	nsq		
C18					Panthere de Sri Lankan	Faiverie				écrit 1 ind	nsq		
C20				<i>Panthera uncia</i>	Panthere des neiges	Faiverie	2	2		écrit 1 ind	nsq		
C21					Panthere des neiges	Faiverie					nsq		
C22				<i>Panthera onca</i>	Jaguar	Tapir	2	2		écrit 2 ind	nsq		
C23					Jaguar	Tapir					nsq		
C35				<i>Panthera tigris</i>	Tigre	Tigres	2	2		écrit 1 mélanges? Indiv?	nsq		
C36			Tigre		Tigres	écrit 2 mélanges? Indiv?				nsq			
C3			Ursidae	<i>Ursus maritimus</i>	Ours polaire	Tigres	3	3		écrit 1 mélange (F+3M)	nsq	99%	
C4					Ours polaire	Ours polaire				écrit2 mélange (F+3M)	nsq		
C5					Ours polaire	Ours polaire				individualisé : mâle malade	nsq		
C24					Suricate	Tapir	4	2		individualisé : femelle	nsq		
C25			Suricate	Tapir	écrit 1 ind	nsq							
C26			Suricate	Tapir	écrit 2 ind	nsq							
C38			Ailuridae	<i>Ailuurs fulgens</i>	Petit Panda	Tapir	2	2		écrit 1 ind	nsq		
C39					Petit Panda	Tapir				écrit 2 ind	nsq		
C27			Mustelidae	<i>Amblonyx cinerea</i>	Loutre cerdée	Tigres	6	1		écrit 2 ind	nsq		
C37					Charie	Charie				selles mélangées	nsq		
C38					Charie	Charie				indiv Lusa	nsq		
C39					Charie	Charie				indiv Lilly	nsq		
C40			Canidae	<i>Zalophus californicus</i>	Charie	Charie	6	6		indiv Speedy	nsq		100%
C41					Charie	Charie				indiv Chuck	ST1		
C42					Charie	Charie				indiv Pioula	nsq		
C43					Charie	Charie				indiv Neon	nsq		
C44			Procyonidae	<i>Nasua nasua</i>	Coati	coati	5	3		indiv mâle	nsq		
C45	Coati	coati			indiv femelle	nsq							
C46	Coati	coati			mélange 3 mâles / femles	nsq							

TOTAL DE POTS	46
TOTAL ESPECES CARNIVORES	16

Annexe 7 : Synthèse des données enregistrées concernant les échantillons de carnivores.



# ANNEXES

Numero de pot	Classe	Ordre	Famille	Espèce	Nom commun de l'animal	Nom du secteur du Zoo	Nb. d'animaux dans le lieu du prélèvement	Nb. de pots par espèce	Selles individualisées (I) ou mélange de selles (M)	Remarques	ST Blasto	% identifié avec le 1er résultat blasto
01	Psittaciformes	Psittacidae	Psittacidae	<i>Ammodramus leucophaea</i>	Ara jacinthe	Macaque	2	1	M	secteur oiselierie, noté 1 sur le pot / selles mélangées	infection maitre	
03				<i>Ara ardens</i>	Ara bleu et jaune	Oiselierie	2	2	M	secteur oiselierie 2 pots / selles mélangées	neg	
04				<i>Ara ardens</i>	Ara bleu et jaune	Oiselierie	2	2	M	noté hybride sur le pot 2 espèces mélangées oiselierie	neg	
05				<i>Ara ardens</i>	Ara bleu et jaune + ara rouge	Macaque	2	1	M	selles des deux espèces mélangées, noté hybride sur le pot	neg	
06				<i>Ara chloroptera</i>	Ara chloroptère	Oiselierie	2	3	M	noté 1 sur le pot, selles des deux espèces mélangées	neg	
07				<i>Ara chloroptera</i>	Ara chloroptère	Oiselierie	2	3	M	noté 2 sur le pot sur l'enquette	neg	
08				<i>Ara chloroptera</i>	Ara chloroptère	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot sur l'enquette	neg	
09				<i>Ara chloroptera</i>	Ara chloroptère	Macaque	2	1	M	selles mélangées	neg	
10				<i>Ara chloroptera</i>	Ara de Bullon	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
11				<i>Ara chloroptera</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
12				<i>Ara chloroptera</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
13				<i>Ara chloroptera</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	25	1	M	noté paon 1 sur le pot	infection maitre	
14				<i>Ara chloroptera</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	25	1	M	noté paon 2 sur le pot	neg	
15				<i>Ara chloroptera</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	50	1	M	Echantillon individualisé	neg	
16				<i>Ara chloroptera</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	50	5	M	noté mélange 1 sur le pot / échantillons maitre	neg	
17				<i>Ara chloroptera</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	50	5	M	noté mélange 2 sur le pot / échantillons maitre	neg	
18				<i>Ara chloroptera</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	50	5	M	noté mélange 3 sur le pot / échantillons maitre	neg	
19				<i>Ara chloroptera</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	50	5	M	noté mélange 4 sur le pot / échantillons maitre	neg	
20				Aves	Phoenicopetridae	Phoenicopetridae	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie	50	1	M
21	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	3	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	ST1	100%
22	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	3	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
23	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M1 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
24	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M2 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
25	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M3 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
26	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M4 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
27	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M5 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
28	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M6 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
29	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M7 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
30	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M8 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
31	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M9 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
32	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M10 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
33	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M11 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
34	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M12 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
35	<i>Phoenicopetris ruber</i>	<i>Phoenicopetris ruber</i>	Oiselierie				50	4	M	noté M13 sur le pot (mélange) échantillon maitre	neg	
36	Accipitriformes	Accipitrinae	Accipitrinae	<i>Egyp. Rappelli</i>	Vautour de Rappell	Macaque	2	3	M	selles mélangées	neg	
37				<i>Aluco indicus</i>	Aluco à tête blanche	Macaque	207	3	M	selles mélangées	neg	
38				<i>Cypocyp. stratus</i>	Cypocyp. stratus	Macaque	7	3	M	selles mélangées	neg	
39				<i>Lophocyp. communis</i>	Lophocyp. communis	Macaque	7	3	M	selles mélangées	neg	
40				<i>Colaptes cafer</i>	Colaptes cafer	Oiselierie	127	1	M	selles mélangées	neg	
41				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	1	1	M	selles mélangées	neg	
42				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
43				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
44				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
45				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
46				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
47				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
48				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
49				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
50				<i>Eurycyp. indicus</i>	Eurycyp. indicus	Oiselierie	2	1	M	selles mélangées	neg	
51	Rhinocerotidae	Rhinocerotidae	Rhinocerotidae	<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
52				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
53				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
54				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
55				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
56				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 6 sur le pot / selles mélangées	neg	
57				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 7 sur le pot / selles mélangées	neg	
58				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 8 sur le pot / selles mélangées	neg	
59				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 9 sur le pot / selles mélangées	neg	
60				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 10 sur le pot / selles mélangées	neg	
61				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 11 sur le pot / selles mélangées	neg	
62				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 12 sur le pot / selles mélangées	neg	
63				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 13 sur le pot / selles mélangées	neg	
64				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 14 sur le pot / selles mélangées	neg	
65				<i>Rhinoceros</i>	Rhinoceros	Oiselierie	2	1	M	noté 15 sur le pot / selles mélangées	neg	
66	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
67				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
68				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
69				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
70				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
71	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
72				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
73				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
74				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
75				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
76	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
77				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
78				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
79				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
80				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
81	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
82				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
83				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
84				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
85				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
86	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
87				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
88				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
89				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
90				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
91	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
92				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
93				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
94				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
95				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
96	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
97				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
98				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
99				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
100				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
101	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
102				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
103				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
104				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
105				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
106	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
107				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
108				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
109				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
110				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
111	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
112				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
113				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
114				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
115				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
116	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
117				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
118				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
119				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
120				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
121	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
122				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
123				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
124				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
125				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
126	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
127				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 2 sur le pot / selles mélangées	neg	
128				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 3 sur le pot / selles mélangées	neg	
129				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 4 sur le pot / selles mélangées	neg	
130				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 5 sur le pot / selles mélangées	neg	
131	Spermatophytes	Spermatophytes	Spermatophytes	<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	noté 1 sur le pot / selles mélangées	neg	
132				<i>Spermatophytes</i>	Spermatophytes	Oiselierie	2	1	M	not		

Numero de pot	Classe	Ordre	Famille	Espèce	Nom commun de l'animal	Nom du secteur du Zoo	Nb. D'animaux dans le lieu du prélèvement	Nb. de pots par espèce	Selles individualisées (I) ou mélange de selles (M)	Remarques	ST	% identité avec le 1er résultat blast	
A1	Mammalia	Chiroptera	Pteropodidae	<i>Pteropus Ruffinensis</i>	Roussettes de rodrique	Plaine Africaine	300	1	M	Un seul pot pour 2 espèces	ST3	100%	
A2				<i>Pteropus aegyptiacus</i>	Roussettes d'Egypte	Plaine Africaine							
A3		Diprotodontia	Macropodidae	<i>Macropus rufus</i>	Kangourou roux	Kangourou	9	2	M	Un seul pot pour 2 espèces. Ech. poolées	ST10	97%	
A4				<i>Macropus fuliginosus</i>	Wallabi à cou rouge	Kangourou	1						
A5		Proboscidae	Elephantidae	<i>Elephas maximus</i>	Elephant Asie	Plaine Africaine			I	indiv femelle 1	ST1	95%	
A6					Elephant Asie	Plaine Africaine	4	4	I	indiv femelle 2	infection mixte		
A7					Elephant Asie	Plaine Africaine			I	indiv femelle 6 ans	infection mixte		
A8		Rodentia	Caviidae	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capibara	Tapir					ns/p		
A9					Capibara	Tapir	2	3	M	1 échantillon Mixte	ST2	100%	
A10					Capibara	Tapir			I	1 échantillon individualisé mâle	ns/p	infection mixte	ND
A11	Reptile	Squamata	Iguanidae	<i>Iguana iguana</i>	Iguane	Vivarium	?	1	?		ns/p		
A12				<i>Eumeces marinus</i>	Anaconda	Vivarium	1	1	I		ns/p		
A13		Testudines	Testudinidae	<i>Alfredorchelonia gigantior</i>	Tortue géante des Seychelles	Vivarium	?	1	I	selles d'un mâle de 120 ans	ns/p		
A14					Tortue	Vivarium	?				ns/p		
A15					Tortue	Vivarium	?				infection mixte		
A16					Tortue	Vivarium	?	5			infection mixte		
A17					Tortue	Vivarium	?				ST9	96%	
A18		Crocodilia	Crocodylidae		Tortue	Vivarium	?				ns/p		
A19				<i>crocodilus cataphractus</i>	Crocodile faux gavia d'Afrique	Vivarium	1	1	I		ns/p		
					TOTAL DE POTS		19						
					TOTAL ESPECES		Min 10						

Annexe 9 : Synthèse des données enregistrées concernant les échantillons du groupe « Autres animaux ».

# ANNEXES

N° chien	Race	Age	Sexe	Résultats coprologie	Diarrhée	Date dernière vermifugation	Traitement au métronidazole
12-765	Teckel	3 ans	F	-	-	panacur 01/09/2012	non
12-769	Jack Russel	2,5 ans	F	-	-	drontal 05/10/2012	non
12-770	Bouvier d'Appenzell	1,5 ans	M	<i>Isospora</i> + / <i>Toxocara</i> ++	-	panacur 10/10/2012	non
12-771	Border	16 mois	F	-	-	panacur 30/09/2012	non
12-772	Samoyède	3 ans	M	-	+	milbemax 01/10/2012	non
12-773	Springer Anglais	5 ans	M	-	-	dolthène 01/09/2012	non
12-774	Border Collie	1 an et 3 mois	F	-	-	milbemax 01/10/2012	non
12-775	Berger Australien	3 ans	F	-	-	panacur 30/09/2012	oui 01/01/2012
12-782	Cavalier King Charles	9 ans	F	-	-	panacur 01/07/2012	oui 15/06/2012
12-799	Border Collie	8,5 mois	M	<i>Isospora</i> +++ / <i>Giardia</i> +++	+	milbemax 26/10/2012	non
12-800	York Shire	4 ans	F	-	-	panacur 01/10/2012	non
12-801	Berger Australien	3 ans	M	-	-	drontal 01/09/2012	oui 01/09/2012
12-802	Cocker Anglais	2,5 mois	F	<i>Giardia</i> ++	-	milbemax 29/10/2012	non
12-803	Cocker Anglais	1 an	M	Trichures +++ / <i>Giardia</i> + / présence de <i>Toxocara</i>	+	milbemax 3x/an	non
12-804	Golden Retriever	1,5 mois	M	<i>Isospora</i> +	-	milbemax 15/09/2012	non
12-805	Berger Australien	11 mois	M	-	-	drontal 10/09/2012	non
12-806	Cocker Anglais	10 mois	F	-	-	milbemax 01/07/2012	non
12-807	Beauceron (fils)	7 mois	M	<i>Toxocara</i> ++ / <i>Isospora</i> +	-	milbemax 10/09/2012	non
12-808	Beauceron (fille)	7 mois	F	<i>Toxocara</i> +	-	milbemax 10/09/2012	non
12-809	Beauceron (mère)	3,5 ans	F	<i>Toxocara</i> +++	-	milbemax 10/09/2012	non
12-811	Labrador	2 ans	M	<i>Isosporidés</i> ++ / spores <i>Cyniclomyces</i>	-	milbemax 27/09/21012	non
12-812	Bouvier appenzell x Berger Australien	2 ans	M	<i>Toxocara</i> +	-	drontal 01/09/2012	non
12-814	Border Collie	5 mois	F	-	+	milbemax 1/10/2012	non
12-815	Border x Springer	3 mois	F	<i>Isospora</i> +++	-	non renseigné	non
12-823	labrador x Braque All	11 ans	M	-	+	milbemax 15/09/21012	non
12-938	Border	6 ans	F	-	-	milbemax 01/10/2012	non
12-939	Bouledogue Français	2,5 mois	F	-	-	13/12/2012	non
12-940	Fox Terrier	3 ans	M	Trichures +	-	milbemax 01/05/2012	non
12-941	Cocker Anglais	1 an	F	<i>Toxocara</i> + / <i>Isospora</i> ++	-	milbemax 13/12/2012	non
12-942	Husky	2 ans	M	<i>Isospora</i> +	-	milbemax 30/11/2012	non
12-943	Setter Gordon	2 ans	F	-	-	panacur 01/10/2012	non
12-944	Berger Allemand x Berger Pyrénées	8 ans	M	-	-	drontal 15/11/2012	non
12-945	Labrador	1,5 ans	M	-	-	milbemax 27/11/2012	non
12-946	Berger Hollandais	3,5 mois	F	<i>Giardia</i> dégénérées +	-	milbemax 27/11/2013	oui 26/10/2012
12-947	Berger	5 ans	F	-	+	panacur 15/10/2012	non
12-949	Jagd Terrier	2,5 ans	F	Oocystes coccidiens + / spores <i>Cyniclomyces</i>	-	panacur 21/10/2012	non
12-952	Berger Australien	3,5 ans	M	-	-	milbemax 01/12/2012	non
12-953	Berger Australien	6,5 mois	F	<i>Giardia</i> +	-	milbemax 01/12/2012	non
12-954	American Staff	3,5 ans	F	-	-	drontal 01/12/2012	non
12-964	Jack Russel	10 ans	M	-	-	milbemax 7/12/2012	non
12-965	Malinois x Groenendal	7 mois	M	Spores <i>Cyniclomyces</i> ++ / autres spores ++	-	milbemax 15/11/2012	non
12-966	Bouledogue x Flat coated	3 ans	F	-	-	milbemax 3/12/2012	non
12-967	Beagle	4 ans	F	-	-	milbemax 10/12/2012	oui 15/10/2012
12-968	Border x Labrador	2 mois	M	<i>Giardia</i> +	-	drontal 18/12/2012	non
12-969	Labrador	2 ans	F	Spores <i>Cyniclomyces</i>	+	panacur 01/09/2012	non
12-970	Bouvier de l'entlebuch	4 ans	M	-	-	milbemax 13/11/2012	non
12-971	Labrador x Border	4 mois	M	<i>Giardia</i> + / <i>Isospora</i> + / <i>Toxocara</i> présence	-	milbemax 17/12/2012	non
12-972	Finnois de Laponie	1 an	M	<i>Giardia</i> ++++ / spores <i>Cyniclomyces</i>	-	dolthène 10/12/2012	non
13-4	Bouledogue Français	4 mois	F	<i>Isospora</i> +++ / <i>Giardia</i> + / spores <i>cyniclomyces</i> +	+		non
13-5	Yorkshire	7 ans	F	Oocystes d' <i>Isosporidés</i> présence / <i>Giardia</i> présence	+		non
13-6	Yorkshire	8 ans	F	<i>Giardia</i> ++ / <i>Isosporidés</i> petite taille +	+		non
13-8	Labrador	2 ans	F	-	+		non
13-18	Berger Allemand	9 mois	F	<i>Toxocara</i> ++++ / <i>Giardia</i> +++ / <i>Isospora</i> + / <i>Taenia</i> présence / <i>Isosporidés</i> +	-	milbemax 12/01/2013	non
13-19	Berger	1 an	F	<i>Giardia</i> + / <i>Isospora</i> + / oocystes coccidiens +	-	drontal 22/12/2012	non
13-23	Berger Blanc Suisse	3 mois	M	Spores <i>Cyniclomyces</i> ++++	+	milbemax 14/01/2013	non
13-24	Eurasier	1 an	F	oocystes coccidiens + / spores <i>Cyniclomyces</i> +	-	milbemax 01/10/2012	non
13-25	Setter Anglais	15 mois	F	<i>Giardia</i> +++ / beaucoup de bacilles	+	milbemax 13/11/2012	non
13-26	Golden Retriever	1,5 ans	F	-	-	dolthène 24/12/2012	non
13-27	Dalmatien	1,5 ans	M	- (bactéries coques)	-	milbemax 20/12/2012	non
13-65				<i>Giardia</i> +++ / <i>Isosporidés</i> petites taille + (crypto - test saccharose)	+		
13-66	Labrador	2 ans	F	-	+	milbemax 30/01/2013	non
13-68	Berger Allemand	10,5 ans	F	Présence d'oocystes d' <i>Isospora</i>	+	aucun depuis 5 ans	non
13-89	Bouledogue Français	9 mois	F	<i>Giardia</i> ++ (petites et grosses)	+	milbemax ts les mois	non
13-111	Setter Anglais	1,5 ans	F	Oocystes d' <i>Isosporidés</i> + / Présence d'oocystes d' <i>Eimeria</i>	+	milbemax 01/01/2013	non
13-112	Berger Allemand	7 mois	M	-	+	panacur 07/02/2013	non
13-128	Basset Hound	8 mois	M	<i>Giardia</i> +	+	dolthène 5/01/2013 panacur 10/01/2013	oui flagyl 10/01/13
13-129	Sharpei	10,5 ans	F	-	+	milbemax ts les 6 mois	non
13-168	Bouledogue	1,5 ans	F	-	+	strantel 12/03/2013	non
13-169	Malinois	1 an	M	<i>Toxocara canis</i> +++ / <i>Ankylostomatidés</i>	+	milbemax 15/01/2013	non



# ANNEXES

13-309	Berger Hollandais	9 mois	F	<i>Giardia</i> ++++ / <i>Isospora</i> présence	+	très variés alternant tous les mois	oui flagyl 31/01/13
13-312	Berger Allemand	1,5 ans	M	<i>Toxocara canis</i> ++ / <i>Ankylostomatidés</i> ++ / <i>Taeniidae</i> présence	+	dolthène 01/03/2013	oui flagyl 12/04/13
13-332	Berger Australien	3 ans	F	-	-	strantel 01/04/2013	non
13-333	Spitz	6 mois	M	-	-	dolthène 24/05/2013	non
13-348	Westi	2,5 ans	F	-	-	milbemax 28/12/2012	non
13-349	Shih-Tzu	10 ans	F	-	-	profender 08/05/2013	non
13-350	Berger Blanc Suisse	8 mois	M	<i>Giardia</i> +	+	milbemax 01/04/2013	non
13-353	Nova Scotia Retriever	9 mois	F	-	-	dolthène 15/03/2013	non
13-356	Labrador	4 ans	F	Spores de <i>Cyniclomyces guttilatus</i>	-	milbemax 15/01/2013	non
13-366	Malamute	9 mois	M	-	-	milbemax 01/03/2013	non
13-371	Labrador	3 ans	F	Spores de <i>Cyniclomyces guttilatus</i> ++++	-	milbemax 01/08/2012	non
13-372	Labrador x Chien chasse	2 ans	F	Oocystes d' <i>Eimeria</i> ++ (spores de <i>Cyniclomyces guttilatus</i> ++++)	-	milbemax 18/04/2013	non
13-373	Beauceron x Husky	5 mois	F	<i>Isospora</i> +++ / <i>Giardia</i> ++ / <i>Ankylostomatidae</i> présence	+	milbemax 24/05/2013	non
13-375	Labrador	7 ans	F	-	-	advocate 14/12/2012	non
13-381	Berger Australien	2 ans	F	-	-	drontal 21/05/2013	non
13-382	Berger des Pyrénées	12 ans	F	-	-	drontal 21/05/2013	non
13-383	Golden Retriever	7 ans	F	<i>Giardia</i> +	-		non
13-384	Labrador	7 ans	F	-	-	drontal 10/01/2013	non
13-385	Sharpei	2,5 ans	M	-	-	drontal 22/05/2013	non
13-388	Bichon frisé	15 ans	F	-	-	milbemax 01/04/2013	oui stomorgyl (20/05-2/06)
13-394	Labrador	5 ans	M	-	-	drontal 15/05/2013	non
13-395	Bouvier Bernois	4,5 ans	M	-	+	drontal 15/05/2013	non
13-401	Labrador	10 mois	F	-	+	milbemax 01/05/2013	non
13-403	Beauceron	1 an	M	-	-	milbemax 19/04/2013	non
13-406	Yorkshire	4 mois	F	-	+	milbemax 01/05 et dolthène 30/05/2013	oui flagyl 22/05/2013 5j
13-413	Briard	6 ans	M	-	-	milbemax 15/01/2013	non
13-437	Boxer x Braque	8 ans	F	<i>Ankylostomatidae</i>	-	vermi pharmacie 10/06/2013	non
13-438	Labrador	3 ans	F	<i>Giardia</i> ++	-	dolthène 20/06/2013	non
13-439	Labrador	2 mois	M	<i>Giardia</i> +	-	dolthène 21/06/2013	non
13-440	Golden Retriever	12 ans	F	-	-	drontal 7/06/2013	non
13-451	Yorkshire	13 ans	F	<i>Giardia</i> +	-	milbemax 01/12/2012	non
13-452	Levrier	7 mois	F	-	-	milbemax 03/06/2013	non
13-453	BA x Terre Neuve	3,5 mois	F	<i>Giardia</i> ++	-	vermi pharmacie 13/06/2013	non
13-455	Epagneul Breton	1,5 ans	F	-	-	milbemax 01/01/2013	non
13-456	American Staff	2,5 ans	F	-	-	drontal 01/05/2013	non
13-457	Beagle	3,5 mois	F	<i>Giardia</i> +	-	milbemax 05/06/2013	non
13-458	Labrador x Berger	3 mois	F	-	-	jamais vermifugé	non
13-460	Golden Retriever	10 ans	M	-	-	drontal 01/06/2013	non
13-461	Cocker Spaniel Anglais	3,5 mois	M	<i>Giardia</i> ++++	-	milbemax 13/06/2013	non
13-464	Jack Russel	3,5 mois	F	-	-	milbemax 12/06/2013	non
13-465	Yorkshire	4,5 mois	M	-	-	drontal 04/04/2013	buccoval 12/06/2013
13-466	Caniche	13 ans	F	-	-	phytothérapie pharma 06/2013	non
13-467	Berger	6 ans	F	-	-	milbemax 01/07/2012	non
13-468	Golden Retriever	15 mois	F	-	-	milbemax 10/06/2013	non
13-469	Rottweiler	2 ans	M	-	-	drontal 01/01/2012	non
13-442	Labrador sable	2 mois		<i>Giardia/Isospora canis/Isospora</i> sp.	+	panacur	
13-441	Labrador noir	4 mois		<i>Giardia/Isospora canis/Isospora</i> sp.	+	panacur	

**Annexe 10 :** Synthèse des données enregistrées concernant la population de chiens étudiée en France.